

A decorative border with a golden-brown floral and vine motif surrounds the text. The border features intricate scrollwork, small flowers, and clusters of grapes, framing the central content.

*Universidad de Ciego de Ávila*  
*“Máximo Gómez Báez”*

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Trabajo de Diploma en Opción al Título de Ingeniero  
Agrónomo.**

**Caracterización morfoanatómica y genes del  
desarrollo floral en plantas de piña (*Ananas comosus*  
(L.) Merrill. cv. Cayena Lisa)**

**Autora: Anabel Verónica Véliz Tusell**

**Tutoras: Dr. Ing. Maita Eulalia Ávila Espinosa  
Dr. Ing. Sara Lázara Pérez Luiz**

**Ciego de Ávila, 2018**

**Universidad de Ciego de Ávila**

**“Máximo Gómez Báez”**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Trabajo de Diploma en Opción al Título de Ingeniero  
Agrónomo.**

**Caracterización morfoanatómica y genes del  
desarrollo floral en plantas de piña (*Ananas comosus*  
(L.) Merrill. cv. Cayena Lisa)**

**Autora: Anabel Verónica Véliz Tusell**

**Tutoras: Dr. Ing. Maita Eulalia Ávila Espinosa  
Dr. Ing. Sara Lázara Pérez Luiz**

**Ciego de Ávila 2018**

## *Pensamiento*

*Las ideas nacen de los conocimientos y de los valores  
éticos.*

*Fidel Castro*

## ***Dedicatoria:***

*Este proyecto de tesis se lo quiero dedicar a mis padres porque gracias a ellos soy quien soy, por brindarme su amor en cada momento del día, por su apoyo incondicional, su comprensión y paciencia, porque lo que antes era apenas una esperanza, pasó a ser una certeza, y por enseñarme que el secreto de la vida no está en vivir sino en vivirla, que la paciencia pueda más que la fuerza y que la confianza en mí misma es el primer secreto del éxito.*

## *Agradecimientos:*

*A mis queridos padres Sonia y José Manuel por ser incondicionales y formarme con mucho amor, por animarme para seguir adelante y enseñarme a luchar por mis sueños y jamás rendirme, por apoyarme en cada momento de debilidad y enseñarme a enfrentar cada momento de adversidad, por hacerme comprender que las cosas simples son las más extraordinarias y sólo los sabios consiguen verlas, por sostenerme para nunca desistir de mis sueños, por sus consejos, en los momentos más difíciles que me ayudaron a salir adelante, llegando así a realizar la más grande de mis metas Mi Carrera Profesional .*

*A mi tutora Maita Eulalia Ávila Espinosa por su dedicación, su apoyo, su atención incondicional y su valiosa colaboración para llegar a conseguir mis objetivos, gracias a ti comprendí que la posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante.*

*A toda mi familia, mis abuelos, mi hermano, mis tíos y tías, mis primas, a Marota, y en especial a mi tía Zaida, por haber aportado un granito de arena y estar siempre a mi lado apoyándome para forjarme y lograr mis sueños.*

*A mis compañeros de clase y amigos en especial a Edel Alejandro Martínez Conde, mi amiguís del alma Geannis Dailin Abdany Alarcón, José Antonio Castro Jiménez, Surimaray Montaña González, Fernando Expósito Cardoso y José Ramón Mendoza Cepero, por*

*estar siempre a mi lado los quiero mucho.*

*#siemprejuntoslossiete.*

*A la Universidad Máximo Gómez Báez, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y a todo su claustro de profesores por forjarme como profesional, en especial a Idania por sus consejos y por su apoyo incondicional en estos 5 años.*

*A la Revolución.*

*Gracias.*

## Resumen:

El presente trabajo se realizó con el objetivo de caracterizar los cambios anatomorfológicos en la diferenciación floral de plantas de piña cultivar Cayena lisa (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Cayena Lisa y la implicación del gen *APETALA1* (*AcPI*) en el proceso. Las plantas fueron tratadas con Ethrel® 48 a razón de 350 mg L<sup>-1</sup> y las yemas fueron colectadas con un intervalo de 12 horas durante las primeras 72 horas y a los 7 y 14, días. El análisis mediante (RT-qPCR), se realizó en el tiempo cero, a las 6; 12; 18 y 24 horas después de aplicado el inductor. Los cortes histológicos realizados, mostraron que la iniciación floral comienza a las 48 horas posteriores al tratamiento de inducción floral con un domo ligeramente ensanchado y protegido por brácteas foliares. La máxima expresión del gen (*AcPI*), fue observada a las 24 horas. Estos resultados contribuyen a mejorar los conocimientos acerca del proceso de diferenciación floral en plantas de piña.

**Abstract:**

The present work was carried out with the objective of characterizing the anatomorphological changes in the floral differentiation of pineapple plants cultivating smooth cayenne (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Lisa Cayenne and the involvement of the APETALA1 gene (*AcPI*) in the process. The plants were treated with Ethrel® 48 at a rate of 350 mg L<sup>-1</sup> and the yolks were collected with an interval of 12 hours during the first 72 hours and at 7 and 14 days. The analysis by (RT-qPCR), was performed at time zero, at 6; 12; 18 and 24 hours after the inducer was applied. The histological sections showed that the floral initiation begins 48 hours after the Floral Induction Treatment with a slightly enlarged dome and protected by foliar bracts. The maximum expression of the gene (*AcPI*) was observed at 24 hours. These results contribute to improve knowledge about the process of floral differentiation in pineapple plants.

## Indice

Resumen:.....	
Abstract:.....	
1. Introducción.....	1
<b>2. Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Generalidades del cultivo de la piña (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill) .....</b>	<b>4</b>
2.2 Transición floral.....	5
2.3 Bases bioquímicas y moleculares de la floración.....	8
2.4 La floración en plantas de piña y factores involucrados.....	11
2.5 Sustancias usadas en la inducción floral en piña y su eficiencia.....	14
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>18</b>
3.1 Generalidades.....	18
3.2 Caracterización anatomorfológica del proceso de floración .....	19
3.3 Caracterización anatomorfológica de los involucros florales .....	19
3.4 Cuantificación de la expresión en tiempo real (RT-qPCR) .....	20
3.5 Extracción de los ARN totales y síntesis de los ADNc.....	20
3.6 Determinación de la expresión relativa en tiempo real (RT-qPCR) del gen. ...	21
<b>4. Resultado y Discusión.....</b>	<b>24</b>
4.1 Caracterización anatomorfológica del proceso de floración .....	24
4.2 Caracterización anatomorfológica de los involucros florales .....	33
4.3 Cuantificación de la expresión en tiempo real (RT-qPCR) .....	34
<b>Conclusiones: .....</b>	<b>37</b>
<b>Recomendaciones: .....</b>	<b>38</b>

## 1. Introducción

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es originaria del sur de Brasil y Paraguay. Su pulpa y productos se comercializan procesados o frescos, por su gran valor nutritivo, agradable sabor, posibilidades de industrialización y su gran belleza. Después del banano y el mango, es la fruta tropical más importante, con una producción mundial en el año 2012 que alcanzó 23 333 886 toneladas, mientras en Cuba fue de 84 068 toneladas (FAOSTAT, 2014). La provincia de Ciego de Ávila, históricamente mantiene la producción de dicha fruta, siendo la Brigada Estatal de Piña de la Empresa Agroindustrial Ceballos quien posee la mayor cantidad de hectáreas de siembra, con un total de 2000 ha.

El desarrollo reproductivo de la piña es inducido por un acortamiento del día, temperaturas nocturnas frescas y está mediado por un incremento en la producción de etileno, o una mayor sensibilidad al mismo, en el meristemo apical del brote desencadenado bajo estas condiciones (Bartholomew *et al.*, 2003).

La transición a la floración es un evento importante en la vida de una planta que se caracteriza por un cambio en el meristema apical del brote, desde la producción de la hoja hasta el inicio de los órganos florales. Dicha transición de desarrollo tiene lugar sólo cuando los factores ambientales y endógenos son más favorables para el éxito reproductivo. El inicio de la floración se sincroniza con las estaciones cambiantes, siendo la duración del día y la temperatura las señales ambientales utilizadas para lograr esto (Corbesier y Coupland 2006, Kobayashi, 2005). Las hormonas vegetales son mensajeros químicos que conectan los cambios ambientales a las respuestas de las plantas, tales como la transición floral que da como resultado la producción de fruta, que es el principal objetivo para la exploración económica de las plantas.

La percepción de una inducción de fotoperíodo específica ocurre en los cotiledones y como consecuencia, se trasmite un estímulo floral hipotético a

los ápices de los brotes. La llegada de un estímulo floral en los meristemos apicales inicia cambios bioquímicos y citológicos (evocación de las flores) que conducen más tarde a la etapa final que es la creación de la flor primordial (diferenciación de las flores). La naturaleza y las propiedades del estímulo de floración son desconocidas (Bernier *et al.*, 1993).

El estudio fisiológico de la transición floral ha conducido a la identificación de varias señales florales putativas como sacarosa, citoquininas (CK), giberelinas (GA) y compuestos reducidos de nitrógeno(N) que se translocan en la savia del floema de las hojas a los meristemos apicales del brote y etileno en Bromelias (Bartholomew *et al.*, 2003). Por otro lado, el enfoque genético desarrollado más recientemente en *Arabidopsis thaliana* ha llevado al descubrimiento de numerosos genes que controlan el tiempo de floración. Operan en cascadas dentro de cuatro vías de promoción: fotoperiódica, autónoma, vernalización y vías de GA. Todas estas vías convergen en un pequeño número de genes integradores FLOWERING LOCUS T (*FT*) y SUPRESOR DE LA SOBREENPRESIÓN DE CONSTANS 1 (*SOC1*), que conducen a la activación de los genes de identidad de meristema floral APETALA1 (*AP1*) y LEAFY (*LFY*) (Blázquez *et al.*, 2011, Wilkie *et al.*, 2008) que desencadenan la transición del meristemo vegetativo al reproductivo.

Independientemente de las referencias del tema a nivel internacional y de estudios realizados en Cuba, no se cuenta con una caracterización de los cambios morfoanatómicos de la floración en plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill), cultivar Cayena Lisa asociado a la expresión de genes de identidad floral. Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó la siguiente **hipótesis**: Una caracterización de los cambios morfoanatómicos de la floración en plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill), cultivar Cayena Lisa asociado a la expresión de genes de identidad floral permitirá interpretar correctamente la respuesta fisiológica de la planta a diferentes condiciones inductivas.

**Objetivo general:** Caracterizar morfoanatômicamente el proceso de inducción floral de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill cv Cayena Lisa, asociado a la expresión de genes de identidad floral.

**Objetivos específicos**

1. Caracterizar los cambios morfoanatômicos de la inflorescencia de las plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill cv Cayena Lisa).
2. Determinar los niveles de expresión de los genes *APETALA1* (AP1) en el proceso de inducción floral de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill cv Cayena Lisa).

## 2. Revisión Bibliográfica.

### 2.1 Generalidades del cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill)

La piña pertenece al orden *Bromeliales* y la familia *Bromeliaceae*, representada por 56 géneros y 2 794 especies. La diversidad de formas silvestres y cultivadas en la parte Norte del Río Amazonas (Orinoquia, Río Negro, Amapá), así como en Paraguay y sur de Brasil confirman la hipótesis de que éste es su centro de origen (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003; Coppens d'Eeckenbrugge y Duval, 2009).

El amplio desarrollo de este cultivo se basa fundamentalmente a las cualidades del fruto consumido de forma fresca o procesada, que constituye fuente de vitaminas, minerales y su pulpa se utiliza como ingrediente en varios alimentos (Bartholomew *et al.*, 2003). Contiene la bromelina que es una enzima proteolítica usada con diversos propósitos en la industria alimenticia, la biotecnológica y la médico farmacéutica. En esta última para la detención del crecimiento de células malignas (Hale *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2012).

Es una especie herbácea perenne, cuya inflorescencia terminal da lugar a un fruto múltiple (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003). Después de la maduración del primer fruto, la planta desarrolla nuevos brotes a partir de yemas axilares que producen otro eje de crecimiento capaz de producir un nuevo fruto. Las yemas del tallo dan lugar a los órganos de propagación, en su región basal surgen los brotes criollos, superiores a éstos los claveles y cerca de la base del fruto los basales. Las plantas adultas pueden alcanzar de 1 a 2m de altura y de 1 a 2 m de ancho. Las principales estructuras morfológicas son distinguibles en el tallo, hojas, pedúnculo, fruto, corona, brotes y raíces.

La inflorescencia está dispuesta en un eje central con filotaxia 8/2 y en su mayoría con más de 200 flores. En *Ananas comosus*, la auto incompatibilidad se produce por la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el tercio superior del estilo (Majumder *et al.*, 1964).

El fruto es un sincarpio formado por la fusión de frutos individuales producidos por cada flor. El número de cada frutillo determina el peso del fruto, que puede variar en dependencia de las variedades desde 0,7 hasta 10 kg, aunque el valor promedio está entre 1,5 a 2 kg (Py *et al.*, 1987).

El cultivo de la piña en su desarrollo vegetativo transcurre por etapas de crecimiento lento hasta completar su madurez fisiológica (Peña *et al.*, 1996). Su ciclo puede estar dividido en tres fases: la vegetativa, que implica desde la plantación a la diferenciación floral; la fase reproductiva (floración - fructificación), ésta comprende la diferenciación floral hasta la maduración del fruto y por último la fase propagativa, la cual empieza en la fase productiva pero continúa después que la fruta es cosechada. Entre esas fases la menos flexible es la reproductiva, independientemente que la floración sea natural o artificial (Reinhardt *et al.*, 2000). Se hace muy necesario el estudio de esta fase para una mejor comprensión y manejo de este proceso fisiológico.

## **2.2 Transición floral.**

Los factores externos que controlan la floración son, entre otros, los cambios estacionales en la duración del día (fotoperíodo) o en la temperatura (vernalización) y los cambios diarios de la temperatura ambiental. Por otro lado, los factores endógenos que controlan la inducción floral son la acumulación de hormonas, fundamentalmente las GAs, o la edad de la planta, y además existe una ruta autónoma.

El efecto de estos factores en la transición floral, así como los cambios fisiológicos y morfológicos que provocan, han sido objeto de estudio durante decenios y los resultados se han descrito en múltiples revisiones (Lebeau, 2009; Meijón, 2009; Mutasa-Göttgens, 2009; Ohto *et al.*, 2010).

El estudio de la morfología de las hojas producidas durante el crecimiento vegetativo muestra que a pesar de la aparente repetición de primordios foliares, existe una progresión continua en tamaño, forma, y en su

disposición a lo largo del tallo lo que denota una continua evolución del meristemo apical. En *Arabidopsis*, por ejemplo, las primeras hojas de la roseta son pequeñas, redondeadas y se encuentran dispuestas por parejas enfrentadas, formando un ángulo de 90°, con la siguiente pareja. Posteriormente, durante el desarrollo de la roseta, las hojas son más grandes tienen forma de espátula y se disponen en espiral a lo largo del tallo (Yu *et al.*, 2012; Zeevart, 2008). Esta progresión en la morfología de las hojas durante el crecimiento vegetativo se observa en multitud de especies herbáceas y podría corresponder, por analogía a lo que ocurre en especies leñosas, con la transición entre una fase juvenil y una fase adulta del meristemo vegetativo apical (Achard., *et al* 2007).

Los factores que inciden en la respuesta a la diferenciación floral, proceso que por lo general es unidireccional, excepto en otros cultivos como los cítricos, donde en algunas etapas es reversible pero sólo parcialmente.

Durante la diferenciación floral, el primer cambio visible del meristemo apical que normalmente produce hojas, es el aumento de su diámetro para iniciar la inflorescencia; después sigue aumentando y comienza el crecimiento del pedúnculo y la aparición de los tejidos basales, primordios de los sépalos y los pétalos; por último hay una disminución del diámetro para formar los primordios de carpelos y óvulos (Coneva., *et al* 2012). Así existe un alargamiento y cambio en la forma del meristemo apical, que al formar la inflorescencia se torna alargado y redondo o cónico. A nivel de toda la planta se observan los siguientes cambios: cesamiento del crecimiento apical indeterminado, supresión de la elongación de los entrenudos y de la formación de yemas axilares, desarrollo de las partes florales y cambios en la filotaxia.

La primera característica de la iniciación floral es la elongación del domo apical de estructura simétrica. La formación de las yemas florales es un proceso duradero aproximadamente de ocho a diez meses durante el cual el ápice vegetativo es transformado en flor. Después de su formación la yema terminal es vegetativa (Coneva., *et al* 2012).

Recientes estudios histo-químicos de los ápices de *Pinus* indican que las células en las cuatro zonas cito-histológicas que pueden ser reconocidas en el meristemo apical no son sólo morfológicamente, sino también bioquímicamente diferentes (Achard., *et al* 2007).

Los primordios foliares forman una espiral alrededor del domo apical y son sucesivamente jóvenes alrededor del tope del domo. Los primordios se forman creciendo hacia fuera, desde el domo apical e incluyen ambas túnicas y células del cuerpo (Wilkie, 2008).

En el estadio reproductivo los ápices florales reemplazan a los vegetativos. Se supone que el ápice vegetativo se reorganiza más o menos bruscamente en el ápice floral y que los ápices son meramente dos formas diferentes de un mismo meristemo (Meijón, 2009).

En la transición a la floración el ápice usualmente cambia su forma marcadamente y algunas veces cambia en tamaño. El cambio en forma está precedido por una elevación del índice mitótico en el ápice Jiang *et al.*, (2010), sin embargo se plantea que el alargamiento de la cúpula apical resulta del incremento proporcional de los tejidos que han sido distribuidos en el domo apical y del primordio de cada plastocromo y no es necesariamente la función del ritmo de crecimiento de las células apicales. Entonces el incremento en el volumen de la cúpula apical quizás sea acompañada por el incremento del ritmo del crecimiento y división celular, como en *Sinepis* o por no cambio aparente en el ritmo de crecimiento como en *Xanthium*, *Epilobium* (Ohto *et al.*, 2010).

Los comienzos de las partes florales del meristemo floral (similares a dedos) se encorvan sobre él marcadamente como el comienzo de la hoja se encorva sobre el meristemo vegetativo apical. En cada uno de los verticilos sucesivos de las partes florales se forman encima y en el interior del verticilo precedente. Los sépalos se forman primero, después los pétalos, los estambres y por último los carpelos (Havelange., *et al* 2006).

### **2.3 Bases bioquímicas y moleculares de la floración.**

La decisión de iniciar la floración es uno de los procesos más importantes de las plantas y está controlada por distintas rutas genéticas que responden a estímulos ambientales y endógenos, activando genes, denominados integradores florales. Los primeros actúan como interruptores que, al encenderse, desencadenan la transición floral y ponen en marcha el programa ABC de desarrollo floral. Toda la información necesaria para determinar el momento de la floración tiene como objetivo controlar a estos interruptores, algo que consiguen las distintas señales ambientales y endógenas (Blázquez *et al.*, 2011).

Entre los factores externos más influyentes, se destacan la duración relativa de los días y las noches (fotoperíodo) y los cambios cíclicos a lo largo del año en la temperatura Beltrán *et al.*, (2012). La respuesta a la duración del día se produce gracias a una dotación de detectores de luz, los fotorreceptores vegetales y a un reloj celular autónomo que marca períodos de 24 horas y permite que cada célula se anticipe a los ciclos de luz y oscuridad y desplace la señal de las hojas al meristemo donde se produce la floración. En este proceso el meristemo cambia la producción de hojas para la iniciación de la flor.

La temperatura es otro factor de gran importancia en la inducción floral. En este caso, se ha descrito que el meristemo apical expuesto a bajas temperaturas en plantas anuales o bianuales durante el crecimiento vegetativo aceleran su diferenciación floral Wollenberg y Amasino, (2012). Al respecto, muchas especies y variedades vegetales muestran diferentes requisitos de exposición al frío antes de florecer. Algunas herbáceas no florecen a menos que se sometan a un período prolongado de frío, y suelen ser plantas bianuales, como la remolacha azucarera. Otras, en cambio, aceleran su floración en respuesta al frío, este es el caso de variedades anuales de invierno, como los cereales de consumo humano (Kumar *et al.*, 2012; Mutasa-Göettgens *et al.*, 2012).

La inducción de la floración a través del transporte de las señales por el floema del locus *FT* de la floración (FT) y de la Giberelina (GA) hasta el ápice de la planta según Yu *et al.*, (2012) el cual reconocen que la sacarosa al moverse por el floema puede representar un factor adicional crítico en el control de la transición a la floración.

Las fitohormonas cumplen un papel importante en la regulación de muchos procesos del desarrollo de la planta. En este caso el efecto más importante sobre el control de la floración lo protagonizan las giberelinas (GAs). En *Arabidopsis thaliana* y un gran número de dicotiledóneas, con una escasa síntesis o percepción de las GAs, florecen más tarde en condiciones de días largos e incluso no florecen cuando el día es corto. Estas observaciones hacen suponer que las GAs permiten asegurar la floración en casos de ausencia de otros estímulos ambientales. Esta fitohormona resulta aún más decisiva en algunas especies que habitan en los trópicos, para las que el paso de las estaciones no supone una señal inductiva (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009).

Adicionalmente, se sabe que las GAs están relacionadas con la inducción floral de las especies frutales y su acción es, en este caso, inhibidora frente a la acción promotora que esta sustancia ejerce en especies herbáceas. Así, en cítricos, se ha comprobado que las GAs inhiben la floración al regular negativamente la expresión del gen *CiFT* (Muñoz- Fambuena *et al.*, 2012). Resultados similares se han obtenido en otras especies frutales como el mango (*Manguifera indica* L.) (Nakagawa *et al.*, 2012).

Por otra parte, el suministro de benzylaminopurina durante ocho horas en la raíz de plantas de *Arabidopsis* cultivadas en hidroponía, fue suficiente para inducir la floración en días cortos (DCs), poco inductivos. Sin embargo, cuando se aplica al meristemo apical en *Sinapis alba*, causa una actividad mitótica temprana en el meristemo apical, en ausencia de la inducción de días largos (DLs) Bernier, (2011). Por esta razón también se reconoce la participación de las citoquininas en la floración en ambas especies.

Además, es posible que las citoquininas y los genes *FT* de plantas de *S.alba* actúen sinérgicamente en el meristemo apical, y sean responsables de la regulación de genes integradores florales tales como *SaSOC1* (*Supresor de la sobre-expresión de Constans1*) y la activación mitótica (D'Aloia *et al.*, 2011; Bernier, 2013).

El ácido abscísico (ABA) regula varios procesos fisiológicos en las plantas, declarándose la primera sustancia identificada como antiflorígeno, al ser considerado como un represor floral. La floración temprana en fenotipos de mutantes deficientes de ABA y alelos de mutantes insensibles al azúcar, contribuyen con este criterio Rolland *et al.*, (2006). Sin embargo, el ABA no parece tener una función general como represor de la floración, porque en algunas especies este proceso puede ser inhibido y en otras no.

En este sentido, Jiang *et al.*, (2010) informaron que la proteína *FCA* (*Control de la Floración en Arabidopsis*), se une al ABA y la interacción tiene efectos moleculares en la ruta autónoma de la floración y por tanto, en la capacidad de la planta a realizar la transición hacia la floración.

Otras fitohormonas como el ácido salicílico (Wada *et al.*, 2010), el etileno (ET) (Achard *et al.*, 2007) y el ácido ascórbico (Kotchoni *et al.*, 2009), son sugeridas como señales florales. Sin embargo, la participación del ET es más evidente en la inducción floral de algunas especies, incluidas las Bromeliáceas, y consideradas como un caso especial (Takeno *et al.*, 2012). También se ha determinado el efecto sobre la estimulación del alargamiento de las estructuras florales probablemente por la mediación de las giberelinas con éste. Adicionalmente se asocia con la actividad del factor de transcripción apétala 2 (AP2), que se liga al elemento de respuesta al etileno y a determinados aspectos de la identidad floral del meristemo y desarrollo del óvulo (Symons *et al.*, 2006).

En un inicio se propuso la existencia de una hormona única y universal llamada "florigeno" la cual actuaba de señal química o estímulo (Chailakhyan, 1936). Sin embargo, sólo recientemente fue atribuido a la

proteína FT su transporte, desde las hojas por el sistema vascular hacia el ápice del tallo, donde se activan los genes cuesta abajo en la cascada de transducción de señales antes que se produzca la floración. Este es uno de los descubrimientos recientes más importantes en la Biología de las plantas (Türck *et al.*, 2008; Zeevart, 2008).

Tras alcanzar el meristemo, la proteína FT forma un complejo con el factor de transcripción FD (locus FD de la floración), el cual se expresa fuertemente en el ápice en condiciones inductivas (Abe *et al.*, 2005). Este complejo FT-FD activa la expresión de otro gen involucrado en la inducción floral, *SOC1*, que integra múltiples señales inductoras como el fotoperíodo, la temperatura, el balance hormonal y las señales relacionadas con la edad de la planta, de modo que su expresión marca el inicio de la inducción floral en los meristemas (Lee y Lee, 2010). Estas evidencias confirman que el proceso de inducción floral ocurre por la acción de múltiples factores, y no por la atribución al florígeno de una función del tipo hormonal.

En el caso de la piña, el silenciado del gen *AcACS2* de la ACC sintetasa (EC 4.4.1.14), la identificación de homólogos parciales del gen *LFY*, *FT*, y *PISTILLATA* (Lingling *et al.*, 2011; Lingling *et al.*, 2012), evidencian cierto avance en el conocimiento de la floración de plantas de piña. Sin embargo, es preciso comprender otros aspectos bioquímicos y moleculares que contribuyan a establecer una red de señalización que integre los factores que se encargan de poner en marcha el desarrollo de la inflorescencia para manejar este proceso en función de la productividad del cultivo.

## **2.4 La floración en plantas de piña y factores involucrados**

La diferenciación floral en plantas de piña tiene gran singularidad al desencadenarse artificialmente por sustancias químicas o de forma natural. Este proceso puede ser mejor comprendido si se conoce el ciclo biológico de la planta, que puede ser de 12 a 30 meses hasta la producción del primer fruto, en dependencia de las condiciones ambientales y de las atenciones al cultivo (Cunha, 2005; Kist *et al.*, 2011).

Para que ocurra la diferenciación floral, el primer cambio morfológico que indica la transición de un meristemo vegetativo a otro reproductivo es el aumento de la división celular en la zona central inmediatamente inferior a la parte apical del meristemo vegetativo (Bartholomew *et al.*, 2003). Este proceso de floración se favorece por el acortamiento de los días, temperaturas frías en la noche, estado fisiológico de las plantas, época de plantación, y edad de las plantas (Van Overbeek y Cruzado, 1948; Cunha, 2009; Kist *et al.*, 2011). Por lo que la susceptibilidad a la floración natural o a la inducción artificial varía de forma general en función de los factores antes mencionados.

Al respecto (Bartholomew *et al.*, 2003) observaron la ocurrencia de floraciones naturales entre diciembre y enero, con un período de temperaturas mínimas, generalmente las nocturnas por debajo de 15 °C; mientras que Wang *et al.* (2007) demostraron que la inducción natural de la floración comienza tardíamente en el mes de noviembre como resultado de los descensos bruscos en la temperatura por el paso de los frentes fríos.

En Cuba se han precisado dos épocas bien definidas de floraciones naturales, en el cultivar Cayena lisa la principal ocurre en el período seco (diferenciación en diciembre - enero), asociada a los frentes fríos y otra secundaria en el período lluvioso (diferenciación en junio - julio) (Iglesia y Soravilla, 1980). Estos criterios establecen que las condiciones climáticas son determinantes en la inducción floral natural y que varía de año en año, de acuerdo con la época y regiones productoras, y su incidencia se acentúa en áreas de altitud y latitud más elevadas (Cunha, 2009). En regiones productoras de piña como México, Brasil y Australia se obtuvieron tasas de floraciones naturales entre el 20% - 80% (Scott, 1993; Reinhardt *et al.*, 1986; Barbosa, 1997).

En plantas de piña una elevada tasa de crecimiento vegetativo puede inhibir o retrasar la floración y reducir la sensibilidad a los estímulos inductores. Una vez que la planta alcanza un tamaño apropiado, los factores ambientales, la reducción de nutrientes y de agua, tienden a reducir la tasa

de crecimiento vegetativo y favorecen la inducción floral (Gaillard, 1969; Bartholomew *et al.*, 2003).

A su vez, Bartholomew *et al.* (2003) consideraron una leve escasez de agua como un factor inductivo, mientras que un estrés hídrico severo resultaba inhibitorio del proceso. Se supone que estas condiciones inducen la biosíntesis de etileno en el ápice del tallo y en la sensibilidad de la planta de forma natural, con un posterior cambio del estado vegetativo a floral.

De forma más específica, el estado fisiológico para iniciar la floración en plantas de piña está siempre correlacionado con la capacidad de la planta en convertir el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en etileno (Bartholomew *et al.*, 2003). Observó que el tenor de ACC aumentó cerca del 40% en invierno, cuando la temperatura mínima media alcanzó 14.5 °C. Plantas que habían formado la inflorescencia presentaban una actividad ACC oxidasa superior en las hojas y el tallo con respecto a las plantas en estado vegetativo (Min y Bartholomew, 1997). En este caso, la producción de etileno en la hoja también fue mayor.

En cuanto al material de plantación, las variaciones observadas con relación a la floración son consecuencia de las diferencias en el tenor de reservas nutricionales y del estado fisiológico de los propágulos. Giacomelli *et al.* (1984) observaron que la masa del propágulo influyó decisivamente en el ciclo de la planta. No obstante, las plantas pequeñas respondieron satisfactoriamente a la inducción natural y artificial.

Este criterio es altamente controversial y sólo recientemente se obtuvieron resultados en una Bromelia ornamental (*Aechmea fasciata*) al tratar plantas jóvenes y adultas con Ethrel (Cong *et al.*, 2013), donde 60 fragmentos de genes con niveles de expresión diferentes entre plantas jóvenes y adultas se relacionaron con la floración. Por todo lo anteriormente expuesto, queda clara la complejidad del proceso de floración en plantas de piña y por qué constituye éste uno de los principales problemas sin resolver, fundamentalmente en floraciones naturales.

## 2.5 Sustancias usadas en la inducción floral en piña y su eficiencia.

Según Rodríguez (1932), el humus fue el primer procedimiento usado para la inducción artificial en piña, debido a un descubrimiento accidental ocurrido en 1885 en las Islas Azores. No obstante, apenas en la década de 1920 se descubrió que el agente que contenía el humo y provocaba la floración, era el gas etileno ( $C_2H_4$ ), un hidrocarburo insaturado. Basado en estos resultados y el reconocimiento posterior del etileno como un regulador del crecimiento en la planta, (Warner y Leopold, 1964), se acepta que la floración en piña sea inducida por esta sustancia o por compuestos liberadores de la misma.

Entre los promotores de la producción de etileno se encuentran el ácido naftalenoacético (ANA), el ácido 2,4-diclofenoxiacético (2.4-D) y el ácido indolacético (AIA). Además, se describen como liberadores de etileno el Ethrel® 48, carburo de calcio y Zeothene (Soler, 1985; Van de Poel *et al.*, 2009).

Yang (1987) informó que antes de ejercer su acción, el etileno tiene que ser biosintetizado por la planta o ser suplido exógenamente por alguno de los productos antes mencionados. Por ejemplo, cuando el Ethrel® 48 alcanza el tejido interno de la planta se descompone, liberando etileno, iones cloro y fosfato, esto ocurre de forma favorable a pH alcalino (Cunha, 2009).

De forma general, el uso de un inductor de la floración y su eficiencia está determinado por diversos factores. Entre ellos están, el cultivar a inducir, condiciones ambientales, modo de aplicación, dosificación del producto, pH de la solución final y la hora de la aplicación (Dass *et al.*, 1976; Cunha y Reinhardt, 1986; Cunha, 2005).

Por esta razón las concentraciones de Ethrel varían de 25 mg·L<sup>-1</sup> en Brasil (Cunha, 2009), 250 mg·L<sup>-1</sup> en Bangladesh (Hussain *et al.*, 2008), 400 mg·L<sup>-1</sup> en China (Sheng *et al.*, 2011) y de 720 a 960 mg·L<sup>-1</sup> en Centro América (Arias y López, 2007). Mientras que en Cuba, el instructivo técnico del cultivo (MINAG, 2011) plantea una concentración de 50 mg·L<sup>-1</sup>, sin diferencias en cuanto a la variedad ni a las condiciones climáticas.

La posibilidad que tiene Ethrel de aumentar los riesgos de efectos fisiológicos secundarios, cuando se utiliza en altas concentraciones, tales como afectaciones en las dimensiones del fruto y la corona así como en la producción de hijos basales (Wee y Ng, 1971; Norman, 1977; De Proft *et al.*, 1986). Además de la necesidad actual de utilizar tecnologías ambientalmente más sustentables, determinan la importancia de controlar en la medida de lo posible, los factores fisiológicos, ambientales y culturales que más influyan en la respuesta a la inducción floral, mediante alternativas que no impliquen incrementos indiscriminados en la concentración del inductor.

Una de las vías para incrementar la eficiencia de la inducción artificial es la adición de urea y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), (Dass *et al.*, 1976; Fahl *et al.*, 1981; Reinhardt y Cunha, 1982; Cunha, 2009). Sin embargo, cuando las condiciones climáticas son desfavorables, como altas temperaturas y baja humedad relativa, aplicaciones múltiples a menudo también pueden propiciar inducciones más exitosas (Py *et al.*, 1987; Turnbull *et al.*, 1999). Referente a este tema, en áreas piñeras, es muy común realizar una segunda aplicación a los siete días después de la primera, para lograr que las plantas que aún se encuentran en estado vegetativo adquieran el estímulo necesario para inducir la floración (Isidró, 2002; Arias y López, 2007).

En un estudio realizado por Cooper y Reese (1942), se observó que los primeros cambios en la morfología del ápice de las plantas de piña ocurrían a los tres días después del tratamiento de inducción floral (TIF). Por lo tanto, aplicaciones que se alejen demasiado del tiempo cero implicarían la entrada de etileno a la célula en un momento donde las estructuras florales ya se encuentran en desarrollo. Por lo que este es un aspecto importante a la hora de desarrollar metodologías de inducción floral con aplicaciones reforzadas.

Por otra parte, el momento de la aplicación debe realizarse preferentemente en horas de la noche, o durante los días nublados, dado las características tipo CAM que presenta este cultivo (Cunha y Reinhardt, 1986).

Otro factor a considerar cuando se realizan inducciones con etileno gaseoso es la solubilidad del mismo, que en agua es dependiente de la temperatura (L'Air Liquide, 1976). Sin embargo, este método está restringido al requerir de equipos específicos para la aplicación, que es viable en plantaciones mecanizadas y con recursos (Soler *et al.*, 2006; Van de Poel *et al.*, 2009).

Zacarías y Lafuente (2008), comunicaron que en las plantas, el etileno ejerce su efecto en muy bajas concentraciones y se manifiesta prácticamente en todas las etapas de su ciclo biológico, desde la germinación hasta la maduración y senescencia o en respuesta a diferentes tipos de estrés. Por tales motivos, las plantas poseen un sistema antioxidante eficiente, que permite reducir los efectos de diferentes tipos de estrés (Asada, 1999, Foyer y Noctor, 2000). Dentro de este sistema, se encuentran las enzimas superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas (Morsya *et al.*, 2007) que evitan fundamentalmente la acumulación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), minimizando su efecto dañino en los tejidos de las plantas (Jaleel *et al.*, 2009).

Además de su función como antioxidante, las peroxidasas presentes en plantas superiores bajo diversas formas moleculares, parecen estar implicadas en distintos procesos fisiológicos como son la iniciación floral, abscisión, alargamiento celular, biosíntesis y degradación de lignina, catabolismo de auxina y mecanismos de defensa y estrés (Escalona *et al.*, 1986; Yoshida *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2004). Estas enzimas muchas veces aumentan su actividad en respuesta al estrés, ya sea biótico o abiótico y procesos oxidativos, por lo que se emplean en muchos casos como marcadores bioquímicos.

La floración en la piña es uno de los procesos más importantes y complejos de su ciclo de vida, con gran versatilidad en su comportamiento debido a la zona de cultivo y el cultivar en cuestión. Por lo que el ingenio de los productores debe estar presente para evitar floraciones naturales o sólo producirlas cuando sea necesario, rentable y con una responsabilidad ecológica en cuanto a las dosificaciones del inductor de la floración a utilizar.

Por tales motivos, ampliar el conocimiento de la inducción floral de plantas de piña cultivar Cayena lisa sobre el estudio de los cambios anatomorfológicos y moleculares permitirá comprender mejor el proceso y así mejorar las tecnologías aplicadas y plantear opciones de adaptación frente al cambio climático que eviten pérdidas en el cultivo por concepto de manejo inadecuado en la fase de floración.

### 3. Materiales y Métodos.

#### 3.1 Generalidades.

Con el objetivo de caracterizar los cambios anatomorfológicos y la posible implicación del gen *AcPI* durante la inducción floral en plantas de piña tratadas con Ethrel® 48, la investigación se realizó en áreas experimentales y laboratorios del centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba y Laboratorio de Fisiología Molecular de las Plantas, Universidad Federal de Lavras (UFLA), Brasil.

Se utilizaron 45 hijos claveles de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill), cultivar Cayena lisa, con una masa entre 200 g y 300 g. Se plantaron en macetas, con diámetro superior de 30 cm, inferior de 25 cm, altura de 30 cm y una mezcla de suelo y materia orgánica en proporción 6:4 (v:v).

Las plantas permanecieron en condiciones controladas a una temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , con un sistema de riego en forma de nebulización que garantizó una humedad relativa entre 60% -70%. La iluminación media fue de  $1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , medidos a las 12:00 horas y un fotoperíodo de 16 horas de luz, ocho de oscuridad. El tratamiento de inducción floral se realizó como se describe en el acápite.

El tratamiento de inducción floral (TIF) consistió en la aplicación de una solución de  $350\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ethrel® 48, la cual contenía 2% de urea y 0.5% ( $\text{CaCO}_3$ ), para incrementar el pH entre 8-9. Por cada planta se aplicó al centro de la roseta 50 mL de la solución final y se contó con dos tratamientos; plantas control (no tratadas) y plantas tratadas.

La variable porcentaje de yemas diferenciadas para su análisis se transformó según la ecuación  $y' = 2 \arccos(y/100)^{0,5}$  y las logarítmicas mediante  $y' = \log_2(y)$ . Las figuras en el acápite Resultados y Discusión, incluyen la información de las pruebas estadísticas que se realizaron en cada caso.

Los análisis estadísticos se realizaron con el utilitario SPSS versión 12 (Pérez, 2005).

### **3.2 Caracterización anatomorfológica del proceso de floración en plantas de piña.**

Para el estudio anatomorfológicos fueron colectadas cinco plantas y de éstas se tomaron 5 ápices (yemas) por cada tratamiento con un intervalo de 12 horas durante las primeras 72 horas (0, 12, 24, 36, 60, 72 horas), y a los 7 y 14, días.

La caracterización de la inflorescencia prosiguió a los 21, 30, 60, 70 y 80 días después de realizado el TIF por medio de la observación visual.

Para seleccionar el ápice caulinar o floral, se practicó un corte longitudinal central que incluía los primordios foliares subyacentes al ápice y se fijaron inmediatamente sumergiéndolas en FAA 50% (solución de alcohol acético y formalina) durante 48 horas, luego se transfirieron al alcohol al 70%, siguiendo el protocolo descrito por Johansen (1940). Las muestras se deshidrataron en una serie de alcohol etílico, 50%, 75%, 85%, 95% y finalmente etanol absoluto y se incluyeron en parafina histológica a 58°C. Se realizaron secciones (transversales y longitudinales) a 20 µm de espesor con un micrótopo giratorio. Los materiales fijados se tiñeron con hematoxilina antes de incrustarlos y seccionarlos.

Se realizaron fotomicrografías anatómicas mediante captura de imágenes bajo un microscopio Nikon microphot-FX.

La incidencia del inductor en el porcentaje de yemas diferenciadas se determinó una vez fotografiados los cortes, para ello se estableció como indicador de estado diferenciado el incremento en altura y ancho del ápice o domo.

### **3.3 Caracterización anatomorfológica de los involucros florales en el proceso de floración.**

La caracterización anatómica de los involucros florales se realizó por medio de microscopia electrónica de barrido, las yemas fueron fijadas en solución Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, formaldehido 2,5%, buffer cacodilato de sodio 0,05 M, pH 7,2, CaCl<sub>2</sub> 0,001 M) y almacenadas.

Las secciones fueron lavadas con un buffer cacodilato y fijadas en tetróxido de osmio 1% por 2 h, deshidratadas en gradiente progresivo de cetona, luego sometidas a un secado a un punto crítico (BAL-TEC, modelo CPD-030, Principality of Liechtenstein), por último montadas en placas de aluminio con doble cinta y metalizadas en evaporador de oro Sputtering (BAL-TEC, modelo SCD-050, Principality of Liechtenstein). Para obtener las secciones transversales, las muestras fueron sumergidas en una solución de glicerol 30% en agua destilada por 30 min, congeladas en nitrógeno líquido y segmentadas con un bisturí. Las secciones fueron posteriormente fijadas en tetróxido de osmio y preparadas conforme fue descrito anteriormente. Todas las secciones fueron analizadas en microscopio electrónico de barrido (LEO, modelo EVO 40 XVP, Cambridge-UK).

### **3.4 Cuantificación de la expresión en tiempo real (RT-qPCR) del gen de identidad floral APETALA1 (*AcPI*) durante la inducción floral en plantas de piña tratadas con Ethrel® 48.**

A tres plantas de cada uno de los tratamientos (Tratadas) y (No tratadas); se les tomó la porción aclorofílica de la hoja "D" (que se congelaron en nitrógeno líquido y conservaron a -80°C hasta la extracción de RNA y posterior análisis mediante (RT-qPCR), en el tiempo cero y a las 6; 12; 18 y 24 horas después de aplicado el inductor.

### **3.5 Extracción de los ARN totales y síntesis de los ADNc.**

Para la extracción del ARN con el método Concert™ Plant RNA-Reagent (Invitrogen), 100 mg de la muestra se colocaron en Eppendorf y se le adicionaron 600 µL de reactivo Concert ARN vegetal, y se homogeneizó en vortex. Luego se incubó durante diez minutos a temperatura ambiente y posteriormente se clarificó por centrifugación durante siete minutos a 23 889 g a 4 °C. Se colectaron 500 µL del sobrenadante y se adicionó 0,1 mL de NaCl y 0,3 mL de cloroformo. Se mezcló la muestra en vortex durante un minuto. Posteriormente se centrifugó a 23 889 g a 4 °C durante diez minutos para separar las fases y nuevamente se obtuvo el sobrenadante y se repitió el procedimiento antes descrito.

Se colectaron 450  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se le adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de alcohol isopropílico. Se mezcló en vortex y se colocó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Al finalizar este período la muestra se centrifugó nuevamente a 23 889 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 25 minutos. Para clarificar las muestras se realizó un lavado con etanol (75 %) (600  $\mu\text{L}$ ). Una vez concluido este proceso se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa para disolver el ARN y se procedió a la cuantificación de éste por medio del espectrofotómetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences). Los ARN se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para su posterior análisis electroforético. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

Para eliminar la contaminación de ADN residual, las muestras se trataron con Turbo DNase-free Kit (Ambion®) y se verificó la integridad del ARN mediante una corrida electroforética. Las muestras con un alto grado de integridad y pureza se utilizaron para la síntesis de ADNc, con el Kit High-Capacity DNAc Reverse Transcription (Applied Biosystems).

Los ARNm se transcribieron de forma reversa con la enzima transcriptasa inversa (RT Súper Script III, Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. La mezcla de la reacción consistió en 20  $\mu\text{L}$  totales divididos en 2,0  $\mu\text{L}$  de tampón de la reacción, 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 2,0  $\mu\text{L}$  de Random Primers, 1,0  $\mu\text{L}$  de retrotranscriptasa y 10  $\mu\text{L}$  de muestra de los ARN totales. Para la síntesis de ADNc las muestras de ARN se estandarizaron a  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . La mezcla de ARN total y cebadores se calentó a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante diez minutos. La mezcla total se incubó durante 120 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego la reacción se detuvo con el aumento de la temperatura a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante cinco minutos. Seguidamente se conservó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6 Determinación de la expresión relativa en tiempo real (RT-qPCR) del gen *AcPI* implicado en el desarrollo floral.**

Para amplificar el fragmento del gen *AcPI*, *Act2* ( $\beta$ -actina) y *GAPDH* como genes de referencia, se diseñaron oligonucleótidos específicos a través de las secuencias publicadas en la base de datos del Banco de Genes (GenBank) para *Ananas comosus*.

Todas las secuencias se introdujeron en una base de datos, se utilizó el programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystems®) y se seleccionaron los pares de oligonucleótidos más adecuados (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especificaciones de los cebadores empleados para el RT-qPCR.

Gen Nombre de la proteína Especie	Nº Accesión	Secuencia del cebador (Sentido, Antisentido)	Tamaño (pb)	Eficiencia (%)
<i>Act2</i> β-actina <i>Ananas comosus</i>	HQ148720. 1	5' CGCGATTTTGCCGAGCT3' 5' CCGGACTCTCTCTGGCAATTAA 3'	91	91
<i>GAPDH</i>	HM768296	TCTCCATCTCCATTTTCGTCTCA ATCCCGATCTTAATCTTCCCAT	93	93
<i>AcP1</i>	HQ717796	CCCACCAGCTTCATCCAGTTAC CCAAAACCTCTTCAGTAGAAACAGCAG T	83	83

Un equipo modelo *ABI PRISM 7500* (Applied Biosystems®) se empleó para la reacción de PCR en tiempo real, con 1,0 µL de ADNc más 0,2 µL de cada primer a 10 µM y Master Mix SYBR green UDG con ROX (Invitrogen®) para un volumen final de 10,0 µL en cada muestra. Las condiciones de la reacción fueron de dos minutos a 50°C, diez minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C y se finalizó con diez minutos a 95°C. Los datos obtenidos se estandarizaron y se expresaron como valores relativos respecto a los niveles de expresión endógena del gen de referencia *Act2*.

Las cadenas simples de ADNc se diluyeron (1:1 - 1:3 - 1:25) para la determinación de la curva patrón, eficiencia de los cebadores y mejor dilución de las muestras. En todos los casos se comprobó la calidad del amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,0% teñidos con 2 µL de *GelRed*, tampón TAE 1x (EDTA 1 mM a pH 8,0; TRIS 40 mM pH 8,0; ácido acético 20 mM) a 110 V.

Los ciclos umbrales se normalizaron con la línea base cuyo valor se fijó en 0,36 unidades de fluorescencia y todos los datos se recogieron y almacenaron en el programa 7500 *Fast Software* (Versión 2.1) entre los ciclos de cuantificación (Cq) 20 y 40. Los valores relativos del número de veces de los niveles de expresión se expresaron según el método matemático Cq comparativo (Pfaffl, 2001), donde el # Veces =  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ;  $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$  (muestra de interés) -  $\Delta Cq$  (muestra de referencia) y  $\Delta Cq = Cq$  (gen de interés) - CT (gen de referencia endógeno).

Los niveles de expresión génica se analizaron por medio del programa *Rotor-Gene Series Pure Detection Software* (Versión 2.0.2).

#### 4. Resultado y Discusión.

##### 4.1 Caracterización anatomorfológica del proceso de floración en plantas de piña.

La (Figura 1) muestra un aumento gradual de yemas diferenciadas en las plantas tratadas con Ethrel® 48, sin embargo en ninguno de los momentos analizados se observaron cambios en las plantas no tratadas. Estos resultados evidencian que la acción del Ethrel® 48 al descomponerse dentro del tejido celular con la consiguiente liberación de etileno, reprograma el patrón de crecimiento en función de la inducción y diferenciación floral. (Bolouri, 2013).

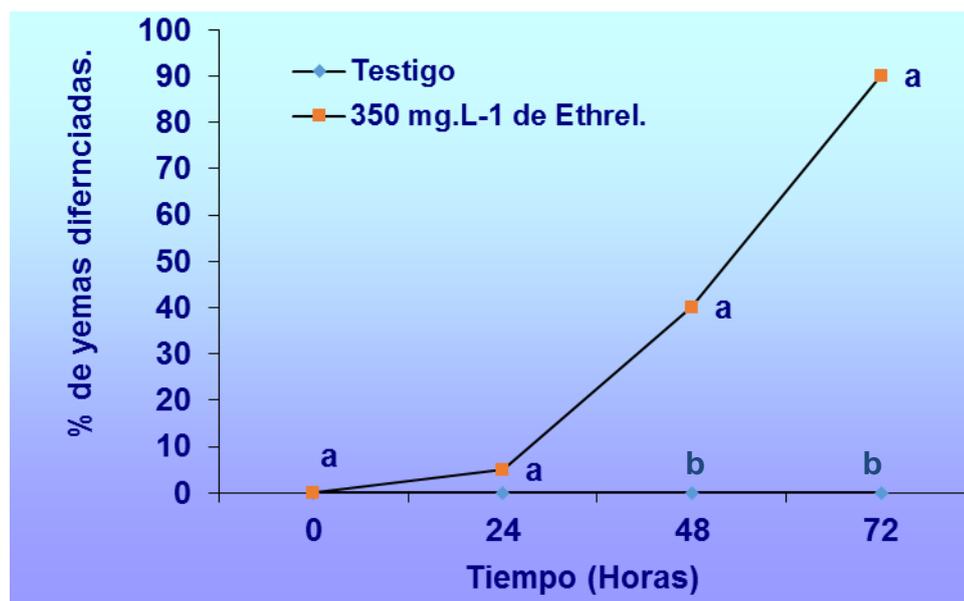


Figura 1. Influencia del Ethrel® 48 sobre la dinámica de la diferenciación floral en la piña cv Cayena Lisa. Según tukey con datos transformados  $2^*(\arcsen\sqrt{x}/100)$ . Letras diferentes difieren significativamente según análisis para  $p < 0.05$

Se sugiere que los cambios experimentados en las plantas de piña la aplicación del Ethrel® 48 propiciaron la unión del etileno a uno de sus receptores (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4) localizados en la superficie del retículo endoplasmático, inhibiendo la función que realiza el represor negativo CTR1 (Constitutive Triple Response1) sobre EIN2 (Ethylene Insensitive2), el cual queda libre para actuar en su ruta de señalización. El EIN2 libre del control del represor migra al núcleo donde activa factores de transcripción de la familia EIN3 que se une al promotor, estimulando la transcripción génica. Por consiguiente, esta cascada de señales y cambios metabólicos terminan en la transición del estado vegetativo a floral. Este criterio de señalización se demostró previamente en tabaco y se considera que ocurra de igual forma en otras especies de plantas (Rieu *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2006).

A partir de estos elementos, es posible considerar al Ethrel® 48 como un factor externo determinante e imprescindible para lograr la inducción floral en plantas de piña (Cunha, 2005).

Una caracterización de los cambios anatómicos y morfológicos más marcados en la transición del ápice vegetativo a floral analizados se muestra a continuación: en el momento considerado como cero (Figura 2 A) las yemas presentan las características clásicas de una yema vegetativa, con un domo aplanado rodeado de brácteas foliares. Las células en la porción terminal permanecen compactadas en una masa indiferenciada, no observándose ningún cambio en el ámbito celular. A las 48 horas (Figura 2 B) comienzan las células que forman el domo a proyectarse y a ensancharse, como una protuberancia central incipiente que caracteriza la primera fase de diferenciación, sin embargo, las brácteas foliares aún se encuentran más cercanas al domo apical (Fornara, 2010). En este momento se puede observar como gradualmente las células desde la zona apical a la zona central se tornan altamente vacuoladas distinguiéndose entre ellas. Las células de la zona apical son pequeñas e isodiamétricas con propiedades tintóreas más cromófilas, lo cual permite que estén densamente coloreadas. Estas constituyen la zona periférica meristemática o túnica (T) del eje

(mantle), este tipo de estructura es denominada organización mantle-core o túnica-corpus. Presentan una relación núcleo-plasmática superior en relación con las capas apicales y subapicales. Estas últimas son poliédricas de  $17 \pm 5$  mm de diámetro.

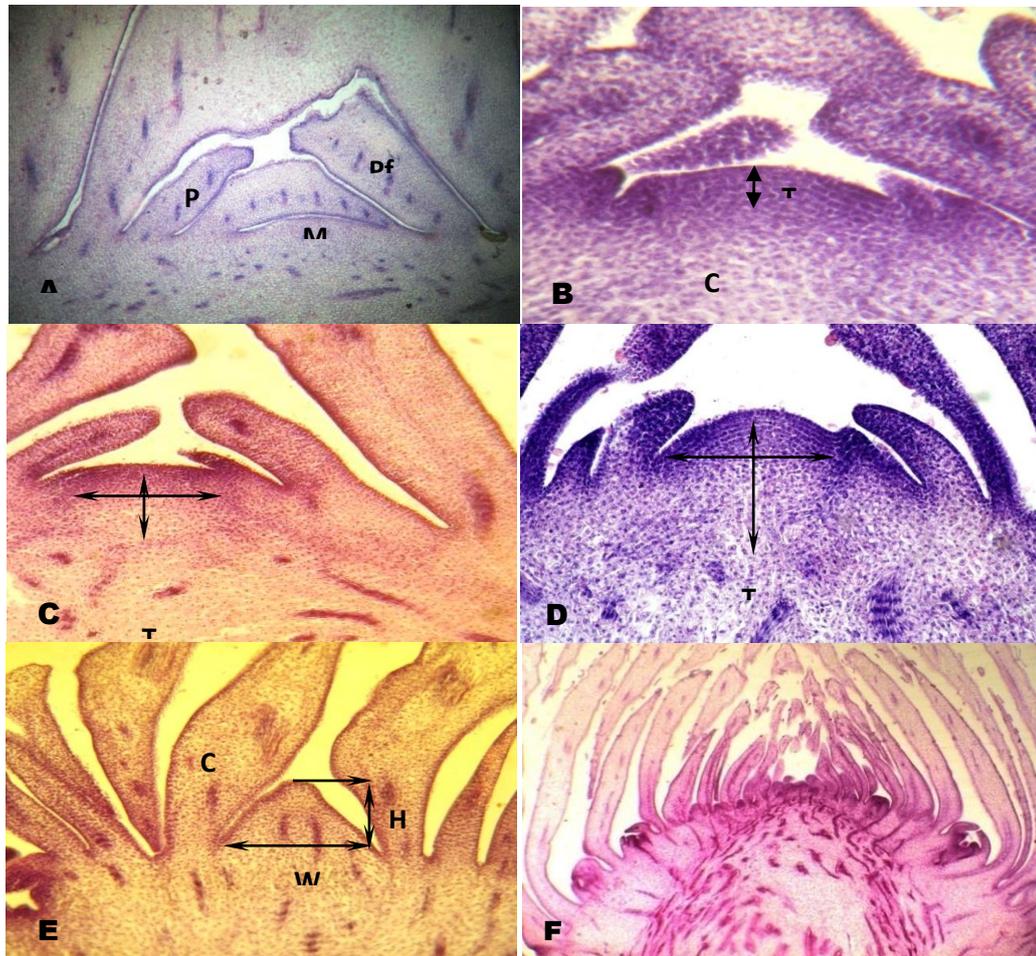


Figura 2. A- F. Secciones del ápice del tallo de piña (*Ananas comosus* cv. Cayena lisa) en diferentes etapas de desarrollo. A, ápice en estado vegetativo, aproximadamente a 50x; B, ápice la planta de piña 48 horas después del (TIF), muestra el inicio de la inflorescencia, aproximadamente a 100x; C, ápice del tallo de piña 72 horas después (TIF) aproximadamente a 40x; D, el ápice del tallo de la planta de piña 7 días después (TIF) a aproximadamente 200x, mostrando la separación de los primordios foliares; E, el ápice del tallo de piña 14 días después (TIF), aproximadamente a 50x; F, ápice del tallo de piña, que muestra los primordios florales en secuencia acropetal, aproximadamente 50x; Pf = primordio foliar; ti = masa indiferenciada; T, túnica; C = corpus; H = Altura y ancho; W = de domo meristemático.

En especies tropicales como el mango, Osuna-Enciso *et al.* (2000) reportó que las divisiones transversales y el alargamiento del eje primario constituyeron las primeras señales de la iniciación del meristemo. Para caducifolios Buban y Faust (1982) describen en manzano un domo vegetativo ligeramente aplanado con un variado número de túnicas y en la iniciación, un eje floral alargado con dos túnicas. En durazno, un meristemo vegetativo de domo convexo conformado por dos túnicas y en el meristemo floral, aplanamiento del domo, eje floral ensanchado y una túnica (Avitia y Castillo, 2007). Estos mismos autores en Ciruelo japonés proponen un meristemo vegetativo en forma de cúpula y un meristemo floral alargado y ensanchado con una primera túnica delimitada y una segunda, no tanto.

A las 72 horas y como consecuencia de la actividad mitótica, (Figura 2 C) se hace mucho más clara la vacuolización de las células en la región central del domo y los primordios foliares que lo protegen se han separado para dar paso al eje que sigue su desarrollo.

Siete días posteriores al tratamiento de inducción floral (Figura 2 D) el meristemo se observa cónico y ensanchado próximo a la iniciación de las estructuras florales. Las células de la zona central del ápice se tornan más vacuoladas con respecto a los estadios anteriores. Esto es la resultante de un proceso de división celular mucho más activo en el centro del eje de la inflorescencia con respecto a las que se encuentran en la superficie (Huang, 2004). Las células que forman el domo comienzan a proyectarse y expandirse sobre una línea sincronizada y el crecimiento anticlinal se evidencia por una característica emergente de protuberancia de la primera etapa de diferenciación, la actividad mitótica se ilustra con más detalle. Hay un aumento en la masa celular corpus túnica de la yema, y un aumento sustancial en el número de células vegetativas del eje de la yema, en el domo expandido, es observable, la definición de las tres capas que comprenden la túnica y el progreso del plastocromo celular vacuolado aumentan en el cuerpo celular. En este sentido Esau (1977), mencionó que el meristemo apical sufre cambios morfológicos cuando entra en estado

reproductivo, como la aparición de apéndices modificados después de que el crecimiento indeterminado del estado vegetativo cesa; enseguida el meristemo apical crece hacia arriba y hacia los lados.

Con el desarrollo de la inflorescencia a los 14 días el eje se elonga marcadamente mostrando un incremento en altura (h) de 110%, mientras que el ancho (w) lo hace 90%, valores comparativos con respecto a una yema no diferenciada (Figura 2 E), de esta forma el eje floral se torna más prolongado y coniforme. Al respecto Bartolomew et al., (2003), plantearon que el desarrollo del eje central en las plantas de piña es un signo evidente de la aparición de la flor posterior a las dos semanas de haberse aplicado el inductor. Giffor (1971) y Cutter (1957) también encontraron un incremento en la dimensión apical con un 81% en altura con aplicación de ANA, coincidiendo con Cutter (1957), quien obtuvo que el alargamiento del domo apical para formar el eje de la inflorescencia fue superior al aumento en ancho en el cultivar Española roja.

El cambio en forma es precedido por un incremento del índice mitótico en el ápice; en *Chrysanthemum spp*, donde el ápice aumenta cerca de 400 veces en el transcurso de unas pocas horas durante la formación de la cabezuela Cutter (1957).

Desde el principio hasta el fin de su desarrollo, el meristemo apical del brote es un sistema en crecimiento y perpetuamente cambiante, dinámico y esencial (Lyndon y Battey, 1985).

El eje floral continúa creciendo proporcionalmente en tamaño a partir de la zona central parenquimatosa (core) y se forman los primordios florales en la periferia del ápice de la inflorescencia (Figura 2 F). Se puede distinguir claramente como aparecen gradualmente los primordios florales en secuencia acropetal hasta que cubre toda la superficie del domo. Iguales observaciones fueron determinadas por Bartolomew *et al.* (2003), quienes observaron un desarrollo acropetal de las flores en la inflorescencia y caracterizaron además la forma en que aparecían las partes de cada flor.

Durante este tiempo prosigue el crecimiento longitudinal del eje de la inflorescencia por divisiones periclinales del meristemo en fila medular.

Estudios anatómicos especializados en diferenciación floral demuestran que en la transición a la floración, la típica organización túnica-carpus del ápice vegetativo puede modificarse. Los cambios difieren algo de una especie a otra, pero son totalmente similares si se forma una inflorescencia o una flor. En el caso de la piña durante su diferenciación según Bartolomew *et al.* (2003), sólo se hace visible al término de siete a diez días tras la aplicación del inductor con un eje central visible aproximado a 2 cm.

Los verticilos florales, pétalos, sépalos y la protuberancia central que dará lugar a los órganos reproductores se muestran en la (Figura 3).

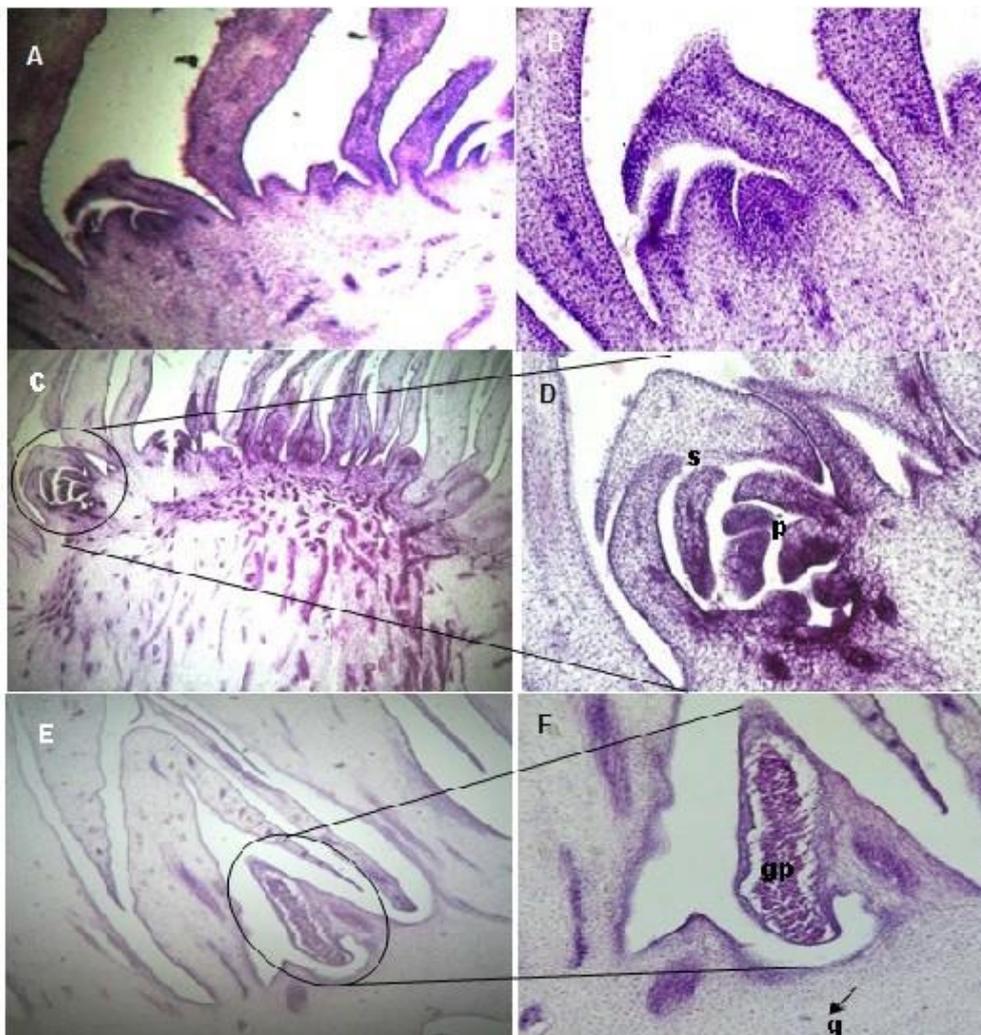


Figura 3. A-F. Diferenciación lateral de brotes Proceso y Estructuras reproductivas. A x 50; B 200 X; C 50 X; D 200X, E 50 x; F 100 x; a = Antera; gp = granos de polen; p = pétalo; s = Sépalo; g = gineceo.

Se aprecia la formación inicial de los sépalos (S) encorvados hacia la zona central (Figura 3 A y B). Posteriormente (Figura 3 C y D) ya se pueden observar los pétalos más encorvados y envueltos por los sépalos, donde a su vez ellos encierran la zona central (Sakamoto, 2001). En esta última se señalan los estambres y una depresión central que posteriormente emergerá para formar el gineceo de la flor. La (Figura 3 E y F) muestra una flor inmadura con el perianto más desarrollado y un estambre con antera en sección longitudinal, que pone de manifiesto su tejido esporógeno formativo del grano de polen. En el centro se inicia una típica protuberancia que dará origen al pistilo.

En la (Figura 4 A y B) se ilustra internamente las anteras de los estambres, donde se puede observar como una invaginación central que divide a la antera en dos tecas (bitecal), cada una de las cuales contiene dos sacos polínicos (tetraesporangeo) también separados externamente por una pequeña invaginación. En estos sacos ocurre la formación de microsporas que se convierten en el gameto masculino o grano de polen, los que se observan con una coloración más violácea.

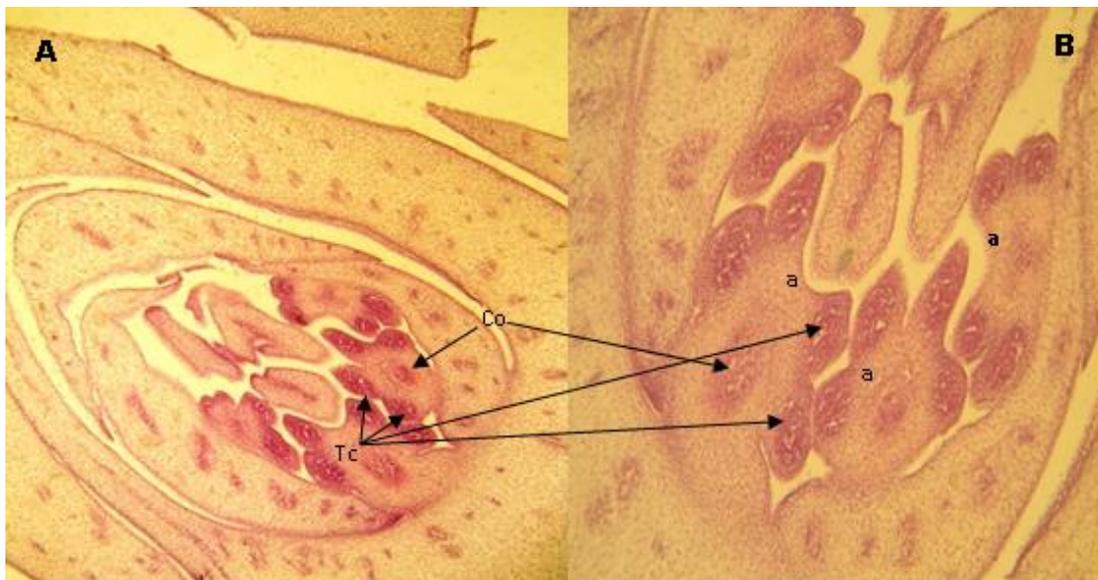


Figura 4. A B. Diferenciación lateral de brotes Proceso y estructuras reproductivas. G 50 x H 200 x; a = Antera; gp = granos de polen; p = pétalo; s = Sepal; g = gineceo.

En la (Figura 5 A) a los 14 días después de realizado el TIF y mediante un corte longitudinal al centro de la planta se hace evidente la elongación del tallo central del ápice, lo que indica el desarrollo continuo de la inflorescencia. El ápice se encuentra rodeado de los involucros foliares con características aclorofílicas. En este momento externamente en el centro de la planta (roseta) aún no hay cambios visibles que posibiliten determinar a simple vista que la planta está diferenciada. (Sakamoto, 2001).

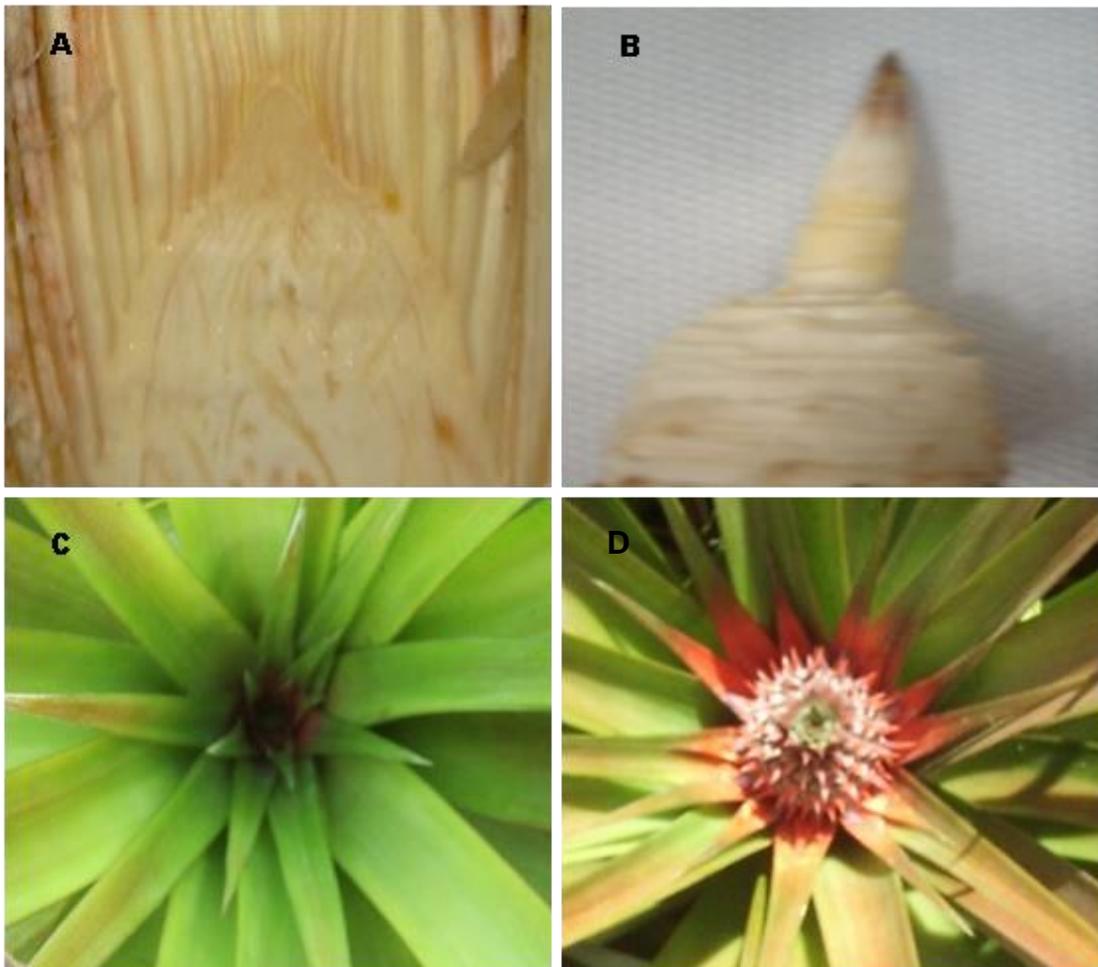


Figura 5. Desarrollo de la inflorescencia en plantas de piña cv Cayena Lisa a los 14 días (A), 21 días (B), 35 días (C), y 60 (D) después del Tratamiento de Inducción Floral.

La (Figura 5 B) muestra la inflorescencia de una planta 21 días después del TIF, con un notorio crecimiento central de la yema, sin embargo, en estos momentos los involucros florales pasan de color aclorofílico a tener una coloración rojiza, lo que difiere del híbrido MD2, donde se mantiene la coloración aclorofílica. A los 35 días después del TIF (Figura 5 C) la roseta de la planta se ensancha para dar paso al crecimiento de la inflorescencia, la cual se hace visible con un color rojizo en la base de las hojas. A los 60 días de inducidas las plantas (Figura 5 D), se observa que las flores dispuestas en forma de espiral y fusionadas entre sí dan paso a la formación del fruto partenocárpico (Bolouri, 2013).

En la (Figura 6), se muestra el desarrollo acropetal de la inflorescencia con una flor abierta de estructura tubular y pétalos de color violeta, mientras que en la parte inferior, hay estambres secos (s) y las brácteas y sepalóides (bs) persisten junto con la fruta. La flor se transforma en un escudete octogonal de cubierta dura, formada por la fusión del ápice de la bráctea y los tres sépalos, que formará la dura piel cerúlea y espinosa del fruto. Cada flor basal se está transformando en una pequeña fruta (Bolouri, 2013)

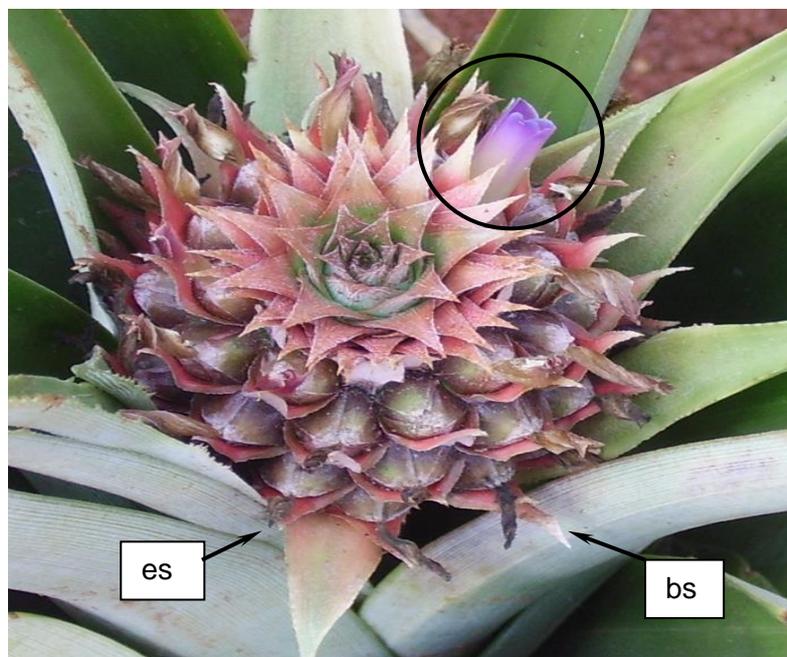


Figura 6. Diferentes estados de la fruta después de la aparición de la roseta; (es) = estambres secos; (bs) = bráctea sepalóides.

#### 4.2 Caracterización anatomomorfológica de los involucros florales en el proceso de floración.

Por medio de la microscopía electrónica de barrido en la (Figura 7 A y B) se evidencia que los involucros foliares presentan células de gran tamaño, de paredes delgadas y sin espacios intercelulares. Además, cuentan con gran cantidad de granos de almidón y paquetes de cristales de oxalato de calcio tipo rafidios.

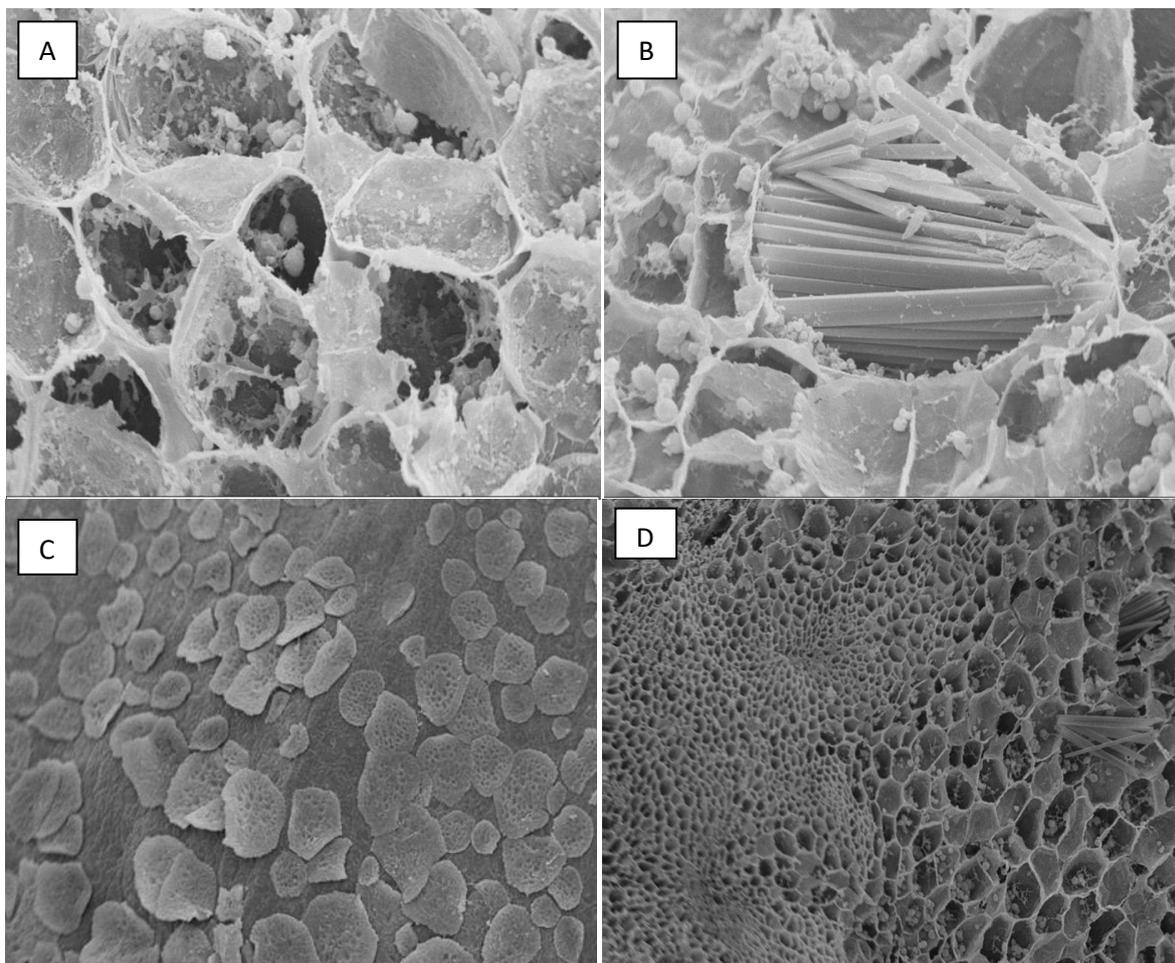


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido mostrando las características de los involucros florales después del TIF. Granos de almidón (A), rafidios en una célula (B), escamas peltadas (C), Rafidios y haces vasculares (D).

Al respecto la existencia de abundantes rafidos en Bromeliaceae ya fue descrita como una generalidad en la especie Tomlinson (1969). Souza *et al.* (2005), Proença y Sajo (2007) indican que dichos cristales pueden tener carácter diagnóstico para la familia. Por su parte la presencia de granos de almidón en los tejidos florales, pudieran ser necesarios para el desarrollo floral. Al respecto Erdelská y Ovečka (2004) observaron que en los casos en que la flor no es fertilizada, una gran proporción de los nutrientes presentes en este tipo de tejido es reciclado por la planta a través del floema en apoyo al proceso.

Los involucros foliares presentan escamas peltadas distribuidas aleatoriamente (Figura 7 C), al respecto Proença y Sajo (2007); Derwidueé y González, 2010 y Quintana *et al.* (2012) explican que las escamas peltadas evitan la transpiración excesiva al cubrir los estomas con la porción alada. Esta función de protección a los estomas podría explicar, en el caso de la piña, que la mayor densidad de escamas se encuentren en el envés, donde se localiza la mayor densidad estomática evitando la excesiva transpiración (Dos Santos *et al.* 2007).

En la (Figura 7 D), se observan haces distribuidos de tamaños variables lo cual, según Van der Merwe *et al.* (1994), son comunes en hojas de monocotiledóneas y según estos autores estas estructuras desempeñan un papel primordial en la distribución del agua en el mesófilo, sustentan y protegen a los tejidos vasculares.

#### **4.3 Cuantificación de la expresión en tiempo real (RT-qPCR) del gen de identidad floral APETALA1 (*AcPI*) durante la inducción floral en plantas de piña tratadas con Ethrel® 48.**

Los genes de identidad del meristemo floral determinan si los meristemas desarrollarán flores en vez de hojas o ramas. En este sentido, la expresión del gen de identidad floral APETALA1 *AcPI* (Figura 8), en ambos tratamientos fue similar durante los primeros tres tiempos de evaluación, sin embargo, una regulación positiva se pudo observar a las 18 y 24 horas en respuesta al Ethrel®48; donde *AcPI* fue cuatro y seis veces más expresado en plantas tratadas con respecto a las control (Huang, 2004).

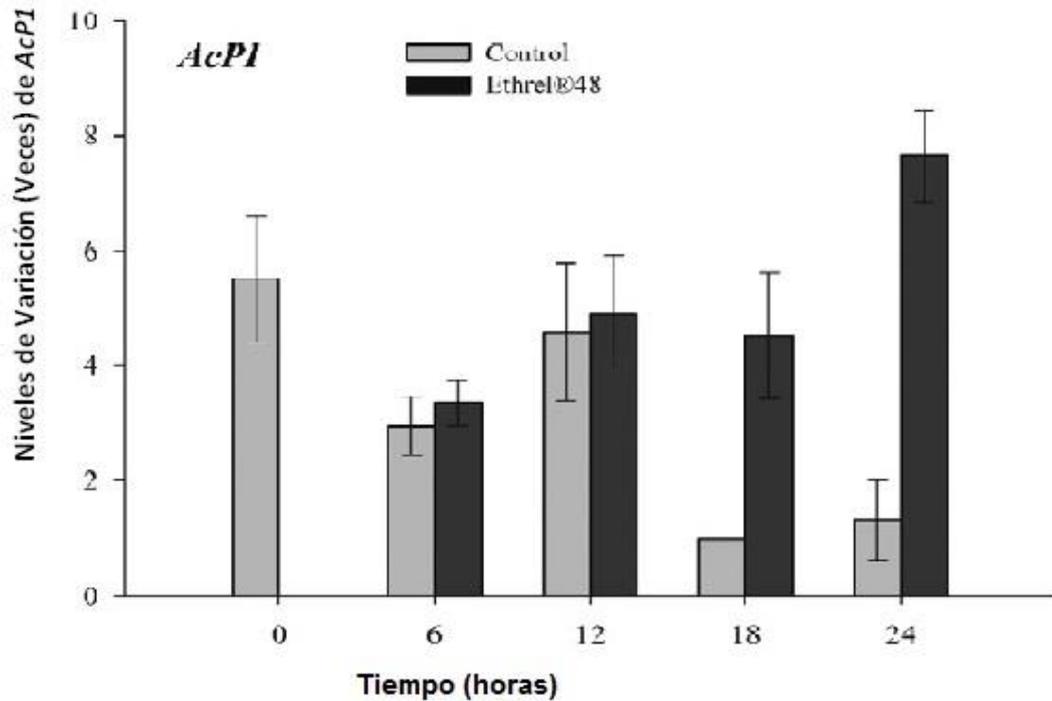


Figura 8. Expresión relativa del gen *AcPI*, en la inducción floral de plantas de piña cultivar Cayena lisa tratadas con Ethrel® 48. Las columnas representan la diferencia de veces en la expresión génica en cada tiempo evaluado, en relación con una muestra testigo. La cuantificación del gen se normalizó por la expresión de los genes de referencia (*β-actina* y *GAPDH*). Los valores de expresión para cada muestra biológica se obtuvieron de tres repeticiones biológicas y las barras de error representan el error estándar para ellas. Los datos se transformaron de acuerdo con  $y' = \log_2(y)$ .

Al tener en cuenta que el gen *AP1* es requerido para que se exprese un patrón a partir del cual surgen los órganos florales, es posible asociarlo a lo descrito en la figura 1, donde a las 48 horas posteriores al TIF se observó el inicio de la inflorescencia. Corroborando estos resultados, la inducción de la diferenciación celular requerida para el inicio de la floración, ocurre específicamente al producirse la activación de los genes de identidad de los

meristemas florales (*LFY* y *AP1*), cuya expresión promueve finalmente la diferenciación de los meristemas florales (Cobersier *et al.*; 2007). Esto sugiere que *AcPI* está involucrado en el control del tiempo de floración y su mayor expresión en el tratamiento con Ethrel®48 ayuda a explicar el mecanismo a través del cual ocurre la inducción de la floral en plantas de piña. En cítricos, la sobreexpresión de los genes de *Arabidopsis LFY* y *AP1* en plantas juveniles transgénicas de Citrange Carrizo fue suficiente para reducir los rasgos juveniles y el tiempo de floración de varios años a 12-20 meses (Peña *et al.*, 2001). La expresión de los principales genes promotores de identidad del meristemo floral, *CsAP1* y *CsLFY* es significativamente superior en los árboles capacitados para florecer (FL-ADULT) en comparación con los no capacitados.

Este estudio proporciona una mejor comprensión de los mecanismos a través de los cuales ocurre la floración de la piña, y sugiere que la misma puede ocurrir a través de diferentes mecanismos. Se amplía el conocimiento sobre los cambios morfohistológicos y moleculares asociados a la inducción y diferenciación floral de la piña ya están presentes en los primeros tiempos después del tratamiento con Ethrel®48.

## Conclusiones:

1. La aplicación de Ethrel®48 presupone cambios bioquímicos que inducen el aumento paulatino de yemas no diferenciadas a diferenciadas, donde a las 48 horas comienza a notarse los primeros cambios en el domo apical el cual se alarga para formar el eje floral.
2. La iniciación floral en yemas apicales de piña presenta un domo aplanado característico, con dos túnicas y un cuerpo.
3. La máxima expresión relativa del gen de identidad floral del meristemo *AcPI* se observó a las 18 y 24 horas después de aplicar Ethrel®48.

**Recomendaciones:**

1. Continuar estudios de microscopía electrónica para relacionar los cambios morfohistológicos con la expresión de otros genes de identidad floral que participan en la floración en plantas de piña.
2. Realizar nuevos estudios que incluyan otros genes que participan en la diferenciación floral, su relación con el etileno, que permitan avanzar en el conocimiento de la floración en plantas de piña.

## Bibliografía.

1. **Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Araki, T. (2005).** FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science Signaling*, 309: 1052-1056.
2. **Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Harberd, N. (2007).** The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 6484-6489.
3. **Arias, S., López, J. (2007).** Manual para la Inducción Floral (Forza) en Piña. (Edi). USAID-RED, Honduras, pp 8.
4. **Asada, K. (1999).** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50: 601-639.
5. **Avitia G., E., y A. M. Castillo González. 2007.** Desarrollo floral en frutales. Primera edición
6. **Barbosa, N. (1997).** Efeito de fitorreguladores e da adubação nitrogenada no controle do florescimento natural precoce do abacaxizeiro. Escola de Agronomia UFBA, Cruz das Almas. Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia, pp 100.
7. **Bartholomew, D., Malézieux, E., Sanewski, G., Sinclair, E. (2003).** Inflorescence and fruit development and yield. En: Bartholomew, D.,

- Paull, R., Rohrbach, K. The pineapple, Botany, production and uses. (Edit). CABI Publishing UK, pp 167-202.
8. **Beltrán, P., Barrera, O., Ortiz, C., López, B. (2012).** Bases moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas. *Ciencia Nicolaita*, 56: 20-34.
  9. **Bernier, G. (2011).** My favourite flowering image: the role of cytokinin as a flowering signal. *Journal of Experimental Botany*, 64: 5795-5799.
  10. **Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A., Lejeune, P. (1993).** Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*, 5: 1147.
  11. **Bernier, G., Périlleux, C. (2013).** A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 3-16.
  12. **Blázquez, M., Piñeiro, M., Blázquez, F. (2011).** Bases moleculares de la floración. *Investigación y Ciencia*, 416:30-36.
  13. **Bolouri Moghaddam, M., Van den Ende, W. (2013).** Sugars, the clock and transition to flowering. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1-6.
  14. **Buban T, Faust M. 1982.** Flower bud induction in apple trees: internal control and differentiation. *Horticultural Reviews* 4, 174– 203
  15. **Chailakhyan, M. (1936).** New facts in support of the hormonal theory of plant development. *CR Acad. Sci. URSS*, 13: 79-83.
  16. **Coneva, V., Guevara, D., Rothstein, S., Colasanti, J. (2012).** Transcript and metabolite signature of maize source leaves suggests a

link between transitory starch to sucrose balance and the autonomous floral transition. *Journal of experimental botany*, 63: 5079-5092.

17. **Cong, H., Li, Z., Xu, L. (2013).** Characterizing developmental and inducible differentiation between juvenile and adult plants of *Aechmea fasciata* treated with ethylene by transcriptomic analysis. *Plant Growth Regulation*, 69: 247-257.
18. **Cooper, W., Reese, P. (1942).** Induced flowering of pineapples under Florida conditions. *Proc. Florida State Hort. So*, 54, 132-138.
19. **Coppens d'Eeckenbrugge, G., Duval, M. (2009).** The domestication of pineapple: context and hypotheses. *Pineapple News*, 16: 15-27.
20. **Coppens d'Eeckenbrugge, G., Leal, F. (2003).** Morphology, Anatomy and taxonomy. En: Bartholomew, D., Paull, R., Rohrbach, K. The pineapple, Botany, production and uses. (Edit). CABI Publishing UK, pp13-33.
21. **Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Coupland, G. (2007).** FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science Signalling*, 316: 1030-1033.
22. **Cunha, G. (1982).** Eficiência do ethephon, em mistura com hidróxido de cálcio e uréia, na floração do abacaxi. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 1: 51-54
23. **Cunha, G. (2005).** Applied aspects of pineapple flowering. *Bragantia*, 64: 499-516.

24. **Cunha, G. (2009).** Fisiologia da floração do abacaxizeiro. En: Carvalho, C., Dantas, A., Pereira, F., Soares, A., Melo Filho, J., Oliveira, G. Tópicos em Ciências Agrárias. (Edit). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, pp.54-75.
25. **Cunha, G., Reinhardt, D. (1986).** Hora de aplicação de fitorreguladores para a indução da floração do abacaxi. En: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Anais. Brasília, 1: 37-40.
26. **Cutter EG. 1957.** Studies of morphogenesis in the Nymphaeaceae. I. Introduction: some aspects of the morphology of *Nuphar lutea* (L.) SM. and *Nymphaea alba* L. *Phytomorphology* 7, 45–56
27. **D’Aloia M, Bonhomme D, Bouche F, Tamseddak K, Ormenese S, Torti S, Coupland G, Perilleux C. (2011).** Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The Plant Journal*, 65: 972-979.
28. **Dass, H., Randhawa, G., Singh, H., Ganapathy, K. (1976).** Effect of pH and urea on the efficacy of ethephon for induction of flowering in pineapple. *Scientia Horticulturae*, 5: 265-268.
29. **De Proft, M., Mekers, O., Jacobs, L; y De Greef J. (1986).** Influence of light and flowering inducing chemicals on the quality of the bromeliaceae inflorescence. *Acta Horticulturae*, 181: 141-146.
30. **Derwidueé F y A. M. González.** 2010. Anatomía foliar en bromeliaceae del nordeste argentino y paraguay. *Bonplandia* 19(2): 153-173.

31. **Dos Santos PC, Dean DR, Hu Y, Ribbe MW (2004).** Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem. Rev.* 104, 1159–1173.
32. **Escalona, M.; N. Nieves, C. Borroto, M. Blanco, J. González-Olmedo. (1986).** Actividad de las peroxidases, niveles endógenos de ABA y GA<sub>3</sub> como respuesta a las aplicaciones de CEPA y PP-333 en lima persa (*Citrus latifolia.*, Tan). En: Memorias. Simposium Internacional. Citricultura. Tropical. pp 285-292.
33. **Erdelská, O. and M. Ovečka. 2004.** Senescence of unfertilized flowers in *Epiphyllum hybrids*. *Biologia Plantarum* 48:381- 388.
34. **ESAU, K. 1977.** Anatomy of Seed Plants. Wiley & Sons Ed. New York, USA. 550 p
35. **Fahl, J., Carell, M., Franco, J. (1981).** Influência de ethephon com e sem uréia no florescimento de plantas de abacaxi (*Ananas comosus*, L., Merrill) 'Cayenne'. *Planta Daninha, Campiñas*, 4: 83-86.
36. **FAOSTAT. (2012).** FAO Statistics Division [on-line]. Visitado: abril, 2014. Disponible: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
37. **Fornara, F., de Montaigu, A., Coupland, G. (2010).** SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 141: 550-550.
38. **Foyer, C., Noctor, G. (2000).** Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146: 359–388.

39. **Gaillard, J. (1969).** Influence of planting date and weight of slips on the growth of pineapples in Cameroon. *Fruits*, 24: 75-87.
40. **Giacomelli, E., Py, C., Lossois, P. (1984).** Estudo sobre o ciclo natural do abacaxizeiro Cayenne no planalto paulista. *Bragantia*, 43: 629-642.
41. **Gifford, JR., and E. G. Cutter. 1971.** The effect of various fixation schedules on the scanning electron microscopic image of *Tropaeolum majus*. *Amer. J. Bot.* 58: 676-680
42. **Hale, L., Greer, P., Trinh, C., Gottfried, M. (2005).** Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clinical Immunology*, 116: 135-142.
43. **Havelange, A., Lejeune, P., Bernier, G., Kaur-Sawhney, R., Galston, A. W. (2006).** Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum*, 96: 59-65.
44. **Hernández, M., Carvajal, C. (2012).** Aislamiento y purificación de preparados enzimáticos de bromelina a partir de tallos de piña (*Ananas comosus* L. Merr). En: Nuevos Productos Naturales para la Industria y la salud. (Edit). Academia Española, pp 117.
45. **Huang, C., Chang, B., Wang, K., Her, S., Chen, T., Chen, Y., Liu, Z. (2004).** Changes in polyamine pattern are involved in floral initiation and development in *Polianthes tuberosa*. *Journal of Plant Physiology*, 161: 709-713.

46. **Hussain, M., Ulla, M., Salim, M., Rahman, M., Sarker, M. (2008).** Effect of different application time of ethrel on off-season pineapple production at srimongal, sylhet. *Int. J. Sustain. Crop Production*, 3: 68-71.
47. **Iglesias, R., Soravilla, L. (1980).** Estudio de las floraciones naturales de la piña cv. Cayena Lisa en plantas de segunda cosecha en la provincia de la Habana. *Ciencia y Técnica en la agricultura. Serie Cítricos y frutales*, 3:103-113.
48. **Isidrón, M. (2002).** Algunas consideraciones técnicas acerca del establecimiento y atenciones al cultivo de la piña. Ciego de Avila: Centro de Bioplantitas; 1-50.
49. **Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H., Panneerselvam, R. (2009).** Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 427-436.
50. **Jiang, B., Chen, S., Miao, H., Zhang, S., Chen, F., Fang, W. (2010).** Changes of endogenous hormone levels during short-day inductive floral initiation and inflorescence differentiation of *Chrysanthemum morifolium* 'Jingyun'. *International Journal of Plant Production*, 4: 149-157.
51. **Johansen, D.A.** Plant microtechnique. New York: McGraw- Hill Book, 1940. 528p.

52. **Kist, H., Ramos, J., Santos, V., Rufini, J. (2011).** Fenologia e escalonamento da produção do abacaxizeiro Smooth Cayenne no Cerrado de Mato Grosso. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 992-997.
53. **Kotchoni, S., Larrimore, K., Mukherjee, M., Kempinski, C., Barth, C. (2009).** Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 149: 803-815.
54. **Kumar, S., Bink, M., Volz, R., Bus, V., Chagné, D. (2012).** Towards genomic selection in apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding programmes: Prospects, challenges and strategies. *Tree Genetics and Genomes*, 8: 1-14.
55. **L’Air Liquide. (1976).** Encyclopedie des gaz. (Edit). Elsevier, Amsterdam.
56. **Lebeau F, Imele J, Teisson C, Delhove G. (2009).** Efficacité de la technique d’induction florale d’*Ananas comosus* (L.) Merr. au moyen de charbon actif enrichi à l’éthylène (TIFBio). *Revue de Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13:395- 400.
57. **Lee, J., Lee, I. (2010).** Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2247-2254.
58. **Lingling, L., Duan, J., Xie, J. H., Liu, Y. G., Wei, C. B., Liu, S. H., Sun, G. M. (2012).** Cloning and Expression Analysis of a PISTILLATA Homologous Gene from Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 1039-1053.
59. **Lingling, L., Guangming, S., Jianghui, X., Jianxia, Z., Shenghui, L., Yuge, L., Jun, D. (2011).** Cloning and expression analysis of a partial

LEAFY homologue from pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.).  
*African Journal of Biotechnology*, 10: 15856-15860.

60. **Lyndon RF, Battey NH. 1985.** The growth of the shoot apical meristem during flower initiation. *Biologia Plantarum* 27, 339– 349
61. **Majumder, S., Kerns, K., Brewbaker, J, Johannessen, G. (1964).** Assessing self-incompatibility in pineapple by a pollen fluorescence technique. *American Society for Horticultural Science*, 84:217-223.
62. **Meijón, M., Valledor, L., Santamaría, E., Testillano, P., Risueño, M., Rodríguez, R., Cañal, M. (2009).** Epigenetic characterization of the vegetative and floral stages of azalea buds: Dynamics of DNA methylation and histone H4 acetylation. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1624-1636.
63. **Min, X., Bartholomew, D. (1997).** Temperature affects ethylene metabolism and fruit initiation and size of pineapple. *Acta Horticulturae*, 425: 329-338.
64. **MINAG. (2011).** Instructivo técnico para el cultivo de la piña. Edición: 2011. La Habana, pp 32.
65. **Morsya, M.; Jouveb, L.; Hausmanb, J.; Hoffmannb, L.; Stewart, J. (2007).** Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 164: 157-167.
66. **Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M. C., Iglesias, D., Primo-Millo, E., Agustí, M. (2012).** Gibberellic acid reduces flowering

- intensity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing CiFT gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31: 529-536.
67. **Mutasa-Göttgens, E., Hedden, P. (2009).** Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1979-1989.
68. **Mutasa-Göttgens, E., Joshi, A., Holmes, H., Hedden, P., Göttgens, B. (2012).** A new RNASeq-based reference transcriptome for sugar beet and its application in transcriptome-scale analysis of vernalization and gibberellin responses. *BMC Genomics*, 13: 99.
69. **Nakagawa, M., Honsho, C., Kanzaki, S., Shimizu, K., Utsunomiya, N. (2012).** Isolation and expression analysis of FLOWERING LOCUS T and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Scientia Horticulturae*, 139:108-117.
70. **Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., Nakamura, K. (2010).** Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 127: 252-261.
71. **Osuna Enciso, T.;** E. Engleman, A. Becerril Román, R. Mosqueda Vázquez, M. Soto Hernández y A. Castillo. 2000. Iniciación y diferenciación floral en mango 'Manila'. *Agrociencia* 34: 573-581.
72. **Peña, H., Díaz, J., Martínez, T. (1996).** La Piña. *Fruticultura Tropical*. (Edit). Félix Varela. pp 3-137.

73. **Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J. A., Navarro, L. y Martínez-Zapater, J. M. 2001.** Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature biotechnology*. 19(3): 263-267.
74. **Pérez, E., Rodríguez, Y., Hernández, M., De la Noval, B. (2004).** Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum mill.*) var. Amalia. inducción y expresión de peroxidasas y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales*, 25: 45-52.
75. **Proença, S.L. y Sajo M.G. 2007.** Estrutura foliar de espécies de Aechmea (*Bromeliaceae*) do estado de São Paulo, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 18: 319-331.
76. **Py, C., Lacoëuilhe, J., Teisson, C. (1987).** The pineapple: cultivation and uses. (Edit). Maisonneuve, G. and Larose, pp 568.
77. **Quintana Claravel G; Sanabria María E; Ojeda Maritza G y Valera Rosario E. 2012.** Efecto de la salinidad sobre la anatomía foliar y radical de la piña (*ananas comosus* (L.) merr.) 'Española Roja'. *Pittieria* 36: 87-108.
78. **Reinhardt, D., Costa, J., Cunha, G. (1982).** Influência da época de plantio, tamanho da muda e idade da planta para a indução floral do abacaxi 'Smooth Cayenne' no Recôncavo Baiano. I. Crescimento vegetativo, produção de mudas e florescimento natural. *Fruits*, 41: 31-41.

79. **Reinhardt, D., Cunha, G. (2000).** Manejo da floração. En: Reinhardt, D., Souza, L., Cabral, J. Produção-aspectos técnicos. (Edit). Brasília, Embrapa, 41-45.
80. **Rieu, I., Eriksson S., Powers, S., Gong F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S., Hedden, P., Phillips, A. (2008).** Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, 20: 2420-2436.
81. **Rodríguez, A. G. (1932).** Smoke and ethylene and pineapple flowering. *Journal of Agriculture University of Puerto Rico, Rio Piedras*, 16: 5-6.
82. **Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006).** Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 675-709.
83. **Sakamoto, T., Kobayashi M., Itoh H., Tagiri A., Kayano T., Tanaka H., Iwahori S., Matsuoka M. (2001).** Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiology*, 125:1508-1516.0
84. **Scott, C. (1993).** The effect of two plant growth regulators on the inhibition of precocious fruting in pineapple. *Acta Horticulturae*, 334: 77-82.
85. **Sheng-hui, L., Xiao-ping, Z., Guang-ming, S. (2011).** Changes in endogenous hormone concentrations during inflorescence induction and development in pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) by ethephon. *African Journal of Biotechnology*, 10: 10892-10899.

86. **Soler, A. (1985).** Induction florale de l'ananas par voie solide: le clathrate d'éthylène. *Fruits*, 40: 321-325.
87. **Soler, A., Teisson, C., Dole, B., Alphonsine, P. (2006).** Forcing in pineapple: what is new?. *Pineapple News*, 13: 27–30.
88. **Souza, R. y NEVES L. J. 2005.** Anatomia foliar de quatro espécies de Tillandsia. *Bromélia* 3: 28-39.
89. **Symons, G., Davies, C., Shavrukov, Y., Dry, I., Reid, J., Thomas, M. (2006).** Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology*, 140: 150-158.
90. **Takeno, K. (2012).** Stress-induced flowering. In: Ahmad, P., Prasad, M. Abiotic Stress Responses in Plants. (Edit). Pringer, New York, pp 331-345.
91. **Türck, F., Fornara, F., Coupland. G. (2008).** Regulation and identity of florigen: flowering LOCUS T moves center stage. *Annu. Rev. Plant Biol*, 59: 573-594.
92. **Turnbull, C., Sinclair, E., Anderson, K., Nissen, R., Shorter, A., Lanham, T. (1999).** Routes of ethephon uptake in pineapple (*Ananas comosus*) and reasons for failure of flower induction. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18: 145-152.
93. **Tomlinson, P.B. 1969.** III - Commelinales-zin- giberales. In: C.R. Metcalfe (ed.). *Anatomy of the Monocotyledons*. Clarendon Press, Oxford 3: 1-446
94. **VAN DER MERWE. A., J. VAN DER WALT. & E. MARAIS. 1994.**

Anatomical adaptations in the leaves of selected fynbos species. *South African Journal of Botany*. 60(2):99-107.

95. **Van de Poel, B., Ceusters, J., De Proft, M. (2009).** Determination of pineapple (*Ananas comosus*, MD-2 hybrid cultivar) plant maturity, the efficiency of flowering induction agents and the use of activated carbon. *Scientia Horticulturae*, 120: 58-63.
96. **Van Overbeek, J., Cruzado, H. (1948).** Note on flower formation in the pineapple induced by low night temperatures. *Plant Physiology*, 23:282-285.
97. **Wada, K., Yamada, M., Shiraya, T., Takeno, K. (2010).** Salicylic acid and the flowering gene FLOWERING LOCUS T homolog are involved in poor-nutrition stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. *Journal of plant physiology*, 167: 447-452.
98. **Wang, R., Hsu, Y., Bartholomew, D., Maruthasalam, S., Lin, C. (2007).** Delaying natural flowering in pineapple through foliar application of aviglycine, an inhibitor of ethylene biosynthesis. *Hortscience*, 42: 1188-1191.
99. **Warner, H.; Leopold, A. (1964).** Ethylene evolution from 2-chloro-ethyl phosphonic acid. *Plant Physiology*, 44: 156-158.
100. **Wee, W; Ng, J. (1971).** The effect of ethrel on the Singapore Spanish pineapple. *Malay's Pineapple*. 1: 5-10.
101. **Wilkie, J., Sedgley, M., Olesen, T. (2008).** Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3215-3228.

102. **Wollenberg, A., Amasino, R. (2012).** Natural variation in the temperature range permissive for vernalization in accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 35: 2181-2191.
103. **Yang, S. (1987).** The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. En: Thomson, W., Nothnagel, E., Huffaker R. *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*. (Edit). The American Society of Plant Physiologists, pp 156-166.
104. **Yoshida, K., P. Kaothien., T. Matsui., A. Kawaoka., A. Shinmyo. (2003).** Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 665-670.
105. **Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y. C., Horrer, D., Zhang, T. Q., Hao, Y. H., Wang, J. (2012).** Gibberellin Regulates the *Arabidopsis* Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING–LIKE Transcription Factors. *The Plant Cell Online*, 24: 3320-3332.
106. **Zacarías, L., Lafuente, T. (2008).** Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. En: Azcón-Bieto J. y Talón M. (eds.). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2da ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana, pp. 445-465.
107. **Zeevart, J. (2008).** Leaf-produced floral signals. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 541-547.
108. **Zhou, H., Cao, W. H., Cao, Y., Liu, J., Hao, Y., Zhang, J., Chen, S. (2006).** Roles of ethylene receptor NTHK1 domains in plant growth, stress response and protein phosphorylation. *FEBS Letters*, 580: 1239.

