

EFFECTOS DE LA LUZ EN CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS DE PLÁNTULAS DE PIÑA (*ANANAS COMOSUS* (L.) MERR) CV. MD-2 EN LA ÚLTIMA ETAPA DE ACLIMATIZACIÓN

René C. Rodríguez-Escriba¹, Daríel López¹, Rosa Becquer¹, Yaima Pino¹, Carlos Aragón¹, Yolanda Garza³, Florencio Podestá², Romelio Rodríguez¹, y Justo González-Olmedo¹.

¹Laboratorio de Agrobiología. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. ²Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, Fundación M. Lillo), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina. ³Dpto. Biotecnología. Facultad Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, México.

Resumen

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr.) "MD-2" posee excelentes cualidades visuales y organolépticas. La propagación de este cultivar en Cuba aún es limitada, por lo que las técnicas de micropropagación juegan un papel importante en su extensionismo agrícola. Se han desarrollado tecnologías con este fin, sin embargo existen problemas con la transición de las plantas desde la fase de aclimatización al campo. Una posibilidad de fortalecimiento de las mismas que favorezca el tránsito es la modulación de CAM induciendo estrés mediante tratamientos lumínicos. En el presente trabajo se evalúan cambios bioquímicos y fisiológicos en plantas creciendo bajo dos condiciones de luz diferentes: plantas con cobertor (PCC) (PAR=250±30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y sin cobertor (PSC) (PAR=800±30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las mediciones de intercambio gaseoso, contenido de clorofilas (*a*; *b*; *totales* y *a/b*), pH de las hojas, índice de succulencia, uso eficiente del agua, proteínas totales y actividad de la Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) fueron evaluadas a los 28 días en ambos tratamientos, cada 3 horas durante el ciclo diario. Se obtuvieron los máximos valores para SC y CC respectivamente, con tasas fotosintéticas de 8,25 y 3,00 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a las 6h, índice de succulencia (2,9 y 0,9), actividad SOD entre las 12 y 18h (28,19 y 16,40 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteínas) y los mínimos valores de pH durante la noche (4 y 6). Ambos tratamientos mostraron comportamiento CAM en diferentes grados, pero el incremento de intensidad lumínica lo favoreció más, y por ende mejoró la adaptación para la plantación en condiciones de campo.

Materiales y métodos

Las plántulas provenientes del cultivo *in vitro* fueron aclimatizadas bajo las condiciones establecidas en el Centro de Bioplantas. Se seleccionaron de acuerdo a los parámetros de calidad establecidos según el protocolo (Daquinta y Benegas, 1997; Escalona *et al.*, 1999). Se aclimatizaron en una casa de cultivo bajo condiciones de 80 ±3 % de humedad relativa (Hr), 25,5 ±2 °C de temperatura (T), luz natural con un flujo de fotones fotosintéticos de 250 ± 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y condiciones atmosféricas de concentración de CO₂ (375-400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) (como promedio para seis meses). Se seleccionaron plántulas de 34-36 g de masa fresca con 11-12 hojas, se asperjaron durante 30 minutos a las 9h durante 10 días, con una mezcla de fertilizante foliar con contenido de 16 g de N-P-K cristalino y 1 g de Multimicro Combi (Haifa Chemicals Ltd., Haifa Bay 26120, Israel) en 16 L de agua. Se separaron en dos grupos y se mantuvieron durante 28 días en diferentes condiciones ambientales determinadas por la intensidad de la luz (ver tabla 1). Los dos grupos fueron regados hasta la saturación del suelo durante dos días y se le aplicó fertilización foliar como se describió anteriormente.

Tabla I. Comportamiento de variables ambientales para las condiciones de las plántulas

Condiciones experimentales	Luz (Día) FFF ($\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	HR (%)		T (°C)	
		Día	Noche	Día	Noche
Plantas sin cobertor (PSC)	800 ± 50	71 ± 3	82 ± 3	32 ± 2	25 ± 2
Plantas con cobertor (PCC)	250 ± 30	68 ± 3	78 ± 3	33 ± 2	22 ± 2

FFF: Flujo de Fotones Fotosintéticos, HR: Humedad relativa, T: Temperatura

Cuantificación del intercambio gaseoso en las hojas

El intercambio gaseoso se cuantificó con un CIRAS-2 (PP Systems CIRAS-2 Portable Photosynthesis System). Se usaron 4 hojas "D" y 50 mediciones para cada momento y tratamiento. La intensidad de la luz de la cubeta fue fijada a un FFF de $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Aragón *et al.*, 2012). El uso eficiente del agua se determinó mediante la razón entre la asimilación de CO_2 y la transpiración.

Determinación del pH de las hojas

Seis hojas "D" fueron colectadas e inmediatamente maceradas en un mortero hasta obtener 0,5 mL de extracto crudo, se le añadió 0,004 g de carbón activado para la absorción de pigmentos y se centrifugó a 12000g. El pH fue inmediatamente cuantificado con el uso de tiras indicadoras de pH (Merck KGaA 64271) como se describe en Aragón *et al.*, 2012.

Cuantificación de clorofilas y cálculo del índice de succulencia mesofílica

Las clorofilas *a*, *b* y totales (*a+b*) fueron determinadas de acuerdo a (Aragón *et al.*, 2012). Las muestras fueron colectadas a las 9h y los resultados se expresan como: $\mu\text{g}(\text{Clorofilas}) \text{g}^{-1}(\text{MF})$. El índice de succulencia mesofílica (ISM) fue calculado de acuerdo a Herrera, 2009.

Extracción y cuantificación de proteínas. Actividad SOD

La extracción se realizó de acuerdo a Wang y Jiang, 2007 y la cuantificación de proteínas según el método de Bradford, 1976. La enzima Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) fue ensayada por el método (McCord y Fridovich, 1969) usando extractos crudos. Una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima capaz de causar el 50% inhibición de la velocidad de reducción del citocromo C. Los resultados se expresan en $\text{U mg}^{-1}(\text{proteínas})$.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software Statgraphics Centurion XV (StatPoint, 2007). Las situaciones que fueron analizadas con el empleo de pruebas paramétricas se le realizó análisis de varianza usando one-way ANOVA para un factor y comparación de medias por Tukey's Multiple Range para rangos múltiples, o pruebas Student's *t*-test. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significación de un 5%.

Resultados y discusión

Intercambio gaseoso

Las máximas tasas de asimilación de CO_2 se obtuvieron en ambos grupos de plántulas entre las 0h y las 6h siendo para las 6h: $8,25$ y $3,1 \mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para PSC y PCC respectivamente (ver figura 1). Estos picos se encuentran dentro de la fase I (entre 0h y las 9h) establecida en el modelo de intercambio gaseoso para CAM (Bartholomew *et al.*, 2003; Nelson y Sage, 2008).

La transpiración mantuvo una tendencia similar en ambos grupos durante todo el ciclo pero se acentúa en PSC, sobre todo durante la fase I, con medias diferentes durante este intervalo. Los máximos valores se registraron a las 6h con $1,22$ y $0,63 \text{mmol}(\text{H}_2\text{O}) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para PSC y PCC respectivamente.

El CO_2 captado durante la fase I representa el 89% del balance neto para PSC y el 77% para las PCC, mientras que para la fase IV (entre 18h y 24h) representan el 19 y 22% para PSC y PCC respectivamente.

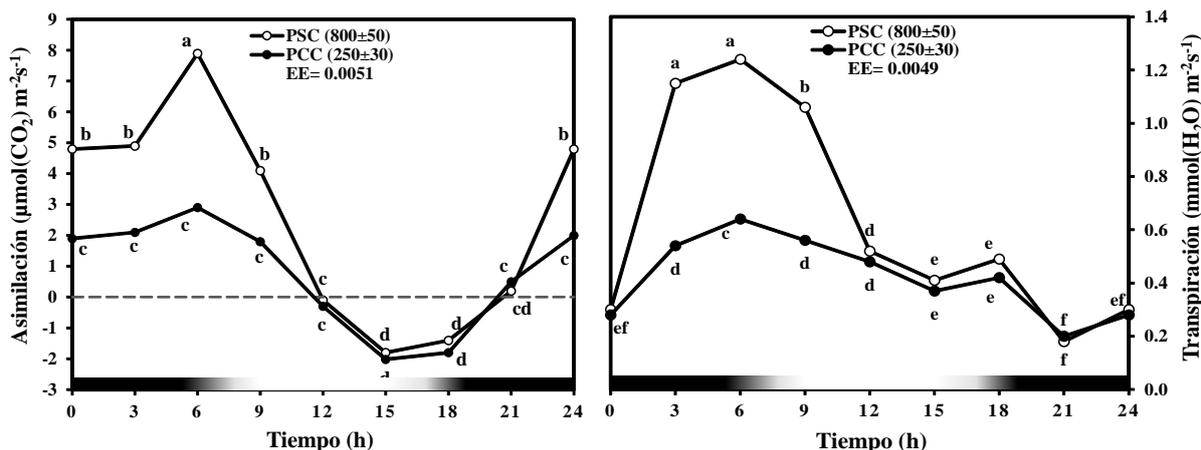


Figura 1. Asimilación de CO_2 ($\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y Transpiración ($\text{mmol}(\text{H}_2\text{O}) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en hojas “D” de plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) “MD-2” creciendo bajo dos condiciones diferentes de luz: plántulas con cobertor (PCC) ($\text{FFF}=250\pm 30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y sin cobertor (PSC) ($\text{FFF}=800\pm 30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Los valores se corresponden a muestras tomadas cada 3h hasta completar un ciclo de 24h. Se comparan las medias para todos los momentos y tratamientos. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente usando pruebas ANOVA, Tukey’s, para $n=120$ con error estándar (EE) y nivel de significación $p\leq 0.05$. Los valores de los momentos 0h y 24h fueron similares. El color negro de la barra inferior representa las horas de noche, el color blanco las horas de día y los gradientes el amanecer y anoecer.

Ambos grupos captan más del 70% del CO_2 durante la fase I por lo que se pueden clasificar como “CAM constitutivas fuertes” (Bartholomew *et al.*, 2003; Nelson y Sage, 2008). Es importante señalar que el porcentaje de asimilación para la fase I en PSC supera en 1,16 veces a las PCC, lo que indica un mayor grado de fortaleza para PSC, además la cantidad de CO_2 asimilado durante la fase II, establecida entre las 9 y 12h representa el 15% y 13% para PSC y PCC respectivamente.

Por otra parte el balance neto para la transpiración muestra que las PSC tuvieron mayor valor que las PCC ($5,65$ y $3,77 \text{ mmo}(\text{H}_2\text{O}) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lo que indica que las PSC transpiraron 1,5 veces más que las PCC. Se debe considerar que la relación para la asimilación de CO_2 (2,65 veces) es superior a la relación entre las transpiraciones lo cual indica una mejor eficiencia hídrica siendo las PSC 2,2 veces más eficientes, esto demuestra un mejor uso de los recursos hídricos y por ende mejor adaptación en estos términos a las condiciones de campo. Un incremento en el uso eficiente del agua es una respuesta adaptativa y de fortalecimiento metabólico en especies CAM terrestres (Lüttge, 2004).

Contenido de clorofilas e índice de succulencia mesofílica

Las PSC mostraron mayor contenido de clorofilas (*a*, *b*, *a+b*) y mayor relación entre clorofilas *a* y *b* (*a/b*) con una diferencia en 0,07 unidades (ver tabla II).

Tabla II. Cambios en el contenido de clorofilas *a*, *b*, totales (*a+b*) y relación (*a/b*) en plántulas bajo dos intensidades de luz PCC ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y PSC ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

Variables	UM	PCC	PSC	EE	Significación.
Clorofila <i>a</i>	$\mu\text{g g}^{-1}(\text{MF})$	18,57	12,23	0,520	(*)
Clorofila <i>b</i>	$\mu\text{g g}^{-1}(\text{MF})$	10,31	7,03	0,290	(*)
Clorofila (<i>a+b</i>)	$\mu\text{g g}^{-1}(\text{MF})$	28,89	19,26	0,810	(*)
Clorofila (<i>a/b</i>)	Adimensional	1,80	1,73	0,021	(*)
ISM	$\text{g}(\text{H}_2\text{O}) \text{mg}^{-1}(\text{Clorofilas})$	4,65	3,61	0,135	(*)

(*) Representa medias con diferencias estadísticas usando Student’s *t*-test $p < 0,05$ para $n=9$

El contenido de clorofilas fue afectado en PSC por la intensidad de luz respecto a las PCC. Esta disminución indica mejor adaptación de los fotosistemas y por ende adaptación de las plántulas a las condiciones de luz solar directa. Por otra parte el índice de succulencia mesofílica (ISM) fue 4,83 y 2,1 g(H₂O) mg⁻¹(Clorofilas) para PSC y PCC respectivamente, donde las PSC duplican a las PCC en 2,3 veces. Se plantea que plantas con ISM superior a la unidad presentan características suculentas (Herrera, 2009). Esto demuestra que ambos grupos se clasifican como CAM pero las PSC mostraron mayor grado.

pH del extracto de hojas y actividad específica SOD (EC 1.15.1.1)

El pH del extracto de las hojas muestra una tendencia similar para ambos grupos (ver figura 2), los máximos valores se obtuvieron a las 15h en PSC y a las 18h en las PCC. La curva para PSC fue más pronunciada ya que el cambio de pH entre el día y la noche fue superior respecto a las PCC. El pH máximo se obtiene a las 15h en PSC (6,2) mientras que en PCC se corresponde a las 18h (6,1) y los valores mínimos se encontraron entre las 0h y 6h con 3,2 y 3,1 para PCC y PSC respectivamente.

Por otra parte el comportamiento de la actividad SOD durante el ciclo completo fue similar (ver figura 2) con máximos entre las 12h y 18h con valores 28,19 y 16,40 U mg⁻¹(proteínas) para PSC y PCC respectivamente y con mínimos entre las 0h y 9h, sin embargo se observan diferencias significativas entre los grupos durante el día.

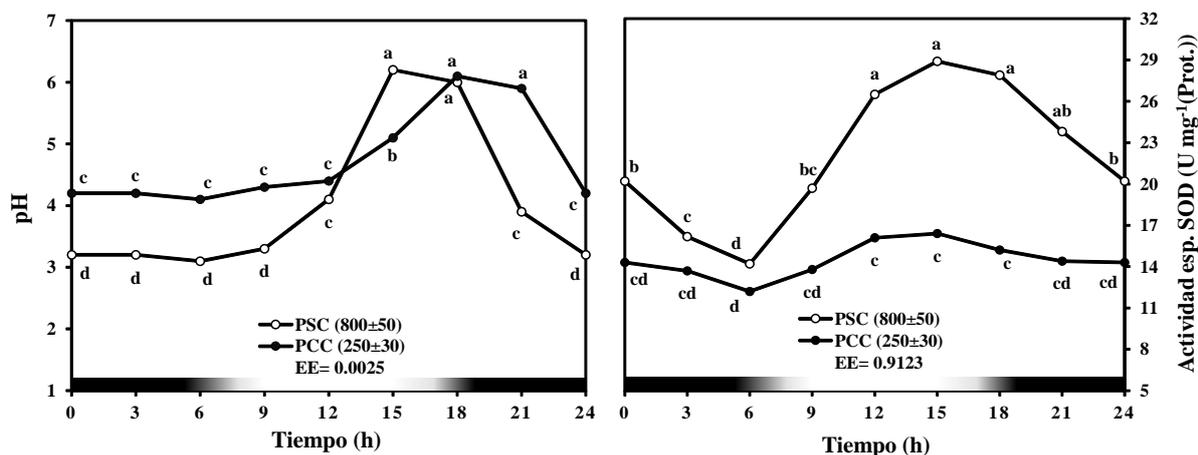


Figura 2. pH y actividad específica para SOD (EC 1.15.1.1) del extracto crudo de hojas “D” de plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) “MD-2” creciendo bajo dos condiciones diferentes de luz: plántulas con cobertor (PCC) (FFF=250±30 μmol m⁻²s⁻¹) y sin cobertor (PSC) (FFF=800±30 μmol m⁻²s⁻¹). Los valores se corresponden a muestras tomadas cada 3h hasta completar un ciclo de 24h. Se comparan las medias para todos los momentos y tratamientos. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente usando pruebas ANOVA, Tukey’s, para n=9 con error estándar (EE) y nivel de significación p≤0.05. Los valores de los momentos 0h y 24h fueron similares. El color negro de la barra inferior representa las horas de noche, el color blanco las horas de día y los gradientes el amanecer y anochecer.

Para las PSC comienza a aumentar el pH a partir de las 9h, tres horas antes que en PCC, esto implica que los niveles de malato debieron ser superiores a las 9h para PSC dado a un incremento en la proporción de asimilación durante la fase I (89% para PSC y 77% para PCC), además se observa una disminución significativa del pH durante toda esta fase (0h a 9h) respecto a PCC, esto está soportado por Popp *et al.*, 2003 y Chen y Nose, 2004. La pendiente de la curva entre las 12h y 15h para PSC es superior a la curva de PCC por lo que la descarboxilación debió ocurrir más rápido, esto puede explicar que el punto de inflexión de la curva (a las 15h) para PSC sea tres horas antes que para PCC. Esto indica un mayor grado de expresión CAM en PSC además de que mientras mayor sea la variación de ácidos entre el día y la noche será más fuerte el metabolismo CAM (Nelson y Sage, 2008).

Los valores de la actividad SOD para PSC fueron siempre superiores que en PCC lo que indica una mejor capacidad de eliminación de las especies reactivas del oxígeno y por ende mejor adaptación a las condiciones de campo respecto a la intensidad de luz. Un incremento de la energía de excitación en los fotosistemas pueden provocar clorosis, decoloración o bronceado en las hojas, además de un desbalance metabólico en respuesta a las señales de las especies reactivas del oxígeno (Breusegem *et al.*, 2001). Esto apoya la disminución en los contenidos de clorofilas y el incremento de la actividad SOD en PSC.

De manera general los resultados muestran un comportamiento similar a plantas “CAM constitutivas fuertes” en ambos grupos, pero niveles superiores de fortaleza en PSC. Los diferentes comportamientos y sus grados pueden ser limitados a especies diferentes o individuales, estos comportamientos constituyen diferentes fisiotipos dentro del metabolismo en sí (Gehrig *et al.*, 2005; Guralnick *et al.*, 2008). Además, diferentes grados de CAM pueden ser expresados temporalmente en una especie dada (Lee y Griffiths, 1987). Esto indica que las PSC muestran una mejor preparación para la transición al campo, ya que muestran una expresión de CAM en mayor grado, superior fortalecimiento metabólico y por ende mejor adaptación a dichas condiciones.

Referencias bibliográficas

- Aragón C, Carvalho L, González-Olmedo JL, Escalona M, Amancio S** (2012) The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Rep* **31**: 757–769
- Bartholomew D, Paul R, Rohrbach K** (2003) The Pineapple. Botany, production and uses, I. *Crop Environ plant growth Physiol* **1**: 320
- Breusegem F Van, Vranova E, Dat JF, Inze D** (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* **161**: 405–414
- Chen L-S, Nose A** (2004) Day-night changes of energy-rich compounds in crassulacean acid metabolism (CAM) species utilizing hexose and starch. *Ann Bot* **94**: 449–455
- Daquinta M, Benegas R** (1997) Brief review of tissue culture of pineapple. *Newsl Pineapple Int Soc Hortic Sci* **3**: 7–9
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González-Olmedo JL, Desjardins Y, Borroto CG** (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* **18**: 743–748
- Gehrig H, Wood J, Cushman M, Virgo A, Cushman J, Winter K** (2005) Large gene family of phosphoenolpyruvate carboxylase in the Crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe pinnata* (*Crassulaceae*) characterised by partial cDNA sequence analysis. *Func Plant Biol* **32**: 467–472
- Guralnick LJ, Cline A, Smith M, Sage RF** (2008) Evolutionary physiology: the extent of C4 and CAM photosynthesis in the genera *Anacampseros* and *Grahamia* of the *Portulacaceae*. *J Exp Bot* **59**: 1735–1742
- Herrera A** (2009) Crassulacean Acid Metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Ann Bot* **103**: 645–653
- Lee HSJ, Griffiths H** (1987) Induction and repression of CAM in *Sedum telephium* L. in response to photoperiod and water stress. *J Exp Bot* **38**: 834–841
- McCord J, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocytes. *J Inorg Biochem* **244**: 6049–6055
- Nelson E, Sage RF** (2008) Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *J Exp Bot* **59**: 1841–1850
- Popp M, Janett H, Lüttge U, Medina E** (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytol* **157**: 649–656
- Wang K, Jiang Y** (2007) Antioxidant responses of *Creeping Bentgrass* roots to waterlogging. *Crop Sci* **47**: 232–236