

# Estudio de los efectos del BioJas® en los indicadores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de las vitroplantas de piña MD-2 en la transición *in vitro-ex vitro*, en condiciones de aclimatización

Justo L. González-Olmedo<sup>1\*</sup>, Andrew Mboghli<sup>1</sup>, René Carlos Rodríguez-Escriba<sup>1</sup>,  
Romelio Rodríguez-Sánchez<sup>1</sup> y Georgina Michelena-Álvarez<sup>2</sup>

1. Centro de Bioplantas, UNICA, Ciego de Ávila, Cuba.

\*justo@bioplantas.cu

2. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Vía Blanca 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba.

## RESUMEN

En la agricultura moderna es determinante garantizar semillas de alta calidad, en cantidades masivas, que sólo el cultivo *in vitro* logra en poco tiempo. Sin embargo en la transición *in vitro - ex vitro* y su posterior permanencia en condiciones de aclimatización, se producen notables pérdidas. El empleo de bioproductos como el ácido jasmónico (formulación BioJas®), producido como derivado de la industria azucarera cubana para inducir respuestas de defensa en las plantas ante el estrés abiótico, permite superar la eficiencia de la propagación. Se determinó el efecto del BioJas® (1 mg.L<sup>-1</sup>) en indicadores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de las plantas cultivadas *in vitro* en la primera fase de aclimatización. El ácido jasmónico atenuó los efectos estresantes en la transición *in vitro - ex vitro*, porque promovió un intercambio gaseoso más eficiente al fijar más CO<sub>2</sub> con menores pérdidas de agua. También aumentó los contenidos de proteínas totales y disminuyó la actividad específica de la enzima superóxido dismutasa, que mejoró la calidad junto a la supervivencia de estas plantas.

**Palabras clave:** ácido jasmónico, vitroplantas de piña, aclimatización.

## ABSTRACT

In modern agriculture it is crucial to guarantee high quality seeds in massive quantities that only *in vitro* culture achieves in a short time. However, in the *in vitro - ex vitro* transition and its subsequent permanence under acclimatization conditions, remarkable losses occur. The use of bioproducts such as jasmonic acid (BioJas® formulation), produced as a derivative of the Cuban sugar industry to induce defense responses in plants against abiotic stress, allows to overcome the efficiency of propagation. The effect of BioJas® (1 mg.L<sup>-1</sup>) on morphological, physiological and biochemical indicators of the plants cultivated *in vitro* in the first acclimatization phase was determined. Jasmonic acid attenuated the stress effects in the *in vitro - ex vitro* transition because it promoted a more efficient gas exchange by fixing more CO<sub>2</sub> with less water losses. It also increased the total protein contents and decreased the specific activity of the enzyme superoxide dismutase, with which the quality was improved together with the survival of these plants.

**Key words:** jasmonic acid, pineapple vitroplants, acclimatization.

## INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) principal representante de la familia *Bromeliaceae*, es cultivada en los trópicos y subtrópicos del mundo para su consumo local y exportación internacional. El cultivar MD-2, ha ganado mercado mundial en los años recientes por transformar el mercado de fruta fresca y la producción industrial de la piña *Bartholomew* (1). La necesidad de introducir esta nueva variedad de piña en plantaciones cubanas requiere altas producciones de material de propagación, que en poco tiempo solo es garantizado por el cultivo *in vitro*. La tecnología de micropropagación es una herramienta eficaz, con muchas ventajas sobre la técnica tradicional de propagación vegetal, ya que permite obtener gran número de plantas en poco tiempo y con mejor calidad. Sin embargo, los protocolos actualmente aplicados en aclimatización, presentan todavía oportunidades para elevar el grado de supervivencia y el desarrollo de las plantas en los primeros días posteriores a la transición *in vitro-ex vitro*. Uno de los jasmonatos más conocidos es el ácido jasmónico (AJ) que actúa, principalmente, como molécula señalizadora de respuesta en plantas a numerosas situaciones de estrés abiótico y biótico. La formulación BioJas®, producida por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), es una excelente alternativa para aplicar a las plantas y atenuar los efectos del estrés abiótico que implica el tránsito a las condiciones *ex vitro*. Con ese objetivo se realizó la investigación que se expone.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios especializados y en las áreas de aclimatización del Centro de Bioplasmas, en la Universidad de Ciego de Ávila. Como material vegetal se emplearon plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivar MD-2 micropropagadas. En la última fase se crearon dos grupos: uno con la formulación Biojas® y, otro que sirvió como control, al se le agregó la misma cantidad de agua destilada. El Biojas® se le añadió al medio, previo a la cocción y se garantizó una concentración de 1 mg.L<sup>-1</sup>. Cada fase del cultivo *in vitro* duró 45 días.

A la salida de los frascos, las 90 plantas de cada grupo se plantaron en recipientes plásticos, con un volumen de sustrato de 190 cm<sup>3</sup>, compuesto por una mezcla de zeolita + cachaza (1:1) (v:v), en un diseño completamente aleatorizado. Las condiciones de aclimatización mantuvieron promedios de temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 70-80 % y condiciones atmosféricas de concentración de CO<sub>2</sub> (375-400 μmol.mol<sup>-1</sup>), e intensidad de luz de 450 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> y régimen de ciclos naturales de fotoperíodo. Esta fase se desarrolló en 42 días.

Se evaluaron las siguientes variables morfológicas de calidad de las plantas: altura de la planta (cm), el número de hojas, longitud de la hoja mayor (cm), número de raíces, longitud de raíz mayor (cm) y la masa fresca (g).

Las evaluaciones fisiológicas se realizaron al inicio de la fase de aclimatización y, posteriormente, a los 14, 28 y 42 días. Como indicadores de variables fisiológicas se midieron la fotosíntesis neta (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) y la transpiración total (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), que se efectuaron con el equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK), acoplado a una cubeta universal (PLC6 de 2.5 cm<sup>2</sup>). Se calculó, a partir de los valores de estas variables, la eficiencia del uso del agua que es la relación entre la fotosíntesis neta y la transpiración total. Este indicador se evaluó cada 14 días, durante 42 días. Además se calcularon los contenidos de clorofilas a, b y totales (μg.g<sup>-1</sup>MF).

Las variables bioquímicas se determinaron con la misma frecuencia que las fisiológicas. Se escogieron diez plantas por tratamiento (siempre respetando el criterio de la categorización de las plantas) como se ha explicado. Las extracciones enzimáticas y de proteínas solubles se realizaron a través del mismo procedimiento: hojas maceradas en nitrógeno líquido, se añadió tampón Tris-HCl 0.1 M,

pH 7.5, se homogeneizó, se centrifugó a 15000 g, durante 20 minutos. La mezcla de reacción para la actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) contenía 20  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 1 mL de tampón fosfato de potasio-KOH 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7.6, 0.1  $\text{mmol.L}^{-1}$  EDTA, 0.01  $\text{mmol.L}^{-1}$  citocromo C, 0.05  $\text{mmol.L}^{-1}$  xantina, 0.03 unidades xantina oxidasa (EC 1.2.3.22) (SIGMA). La mezcla xantina-xantina oxidasa fue la fuente de radicales superóxido y se siguió el método del citocromo C (550 nm) (coeficiente de extinción a 340=21.1 ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )-1  $\text{cm}^{-1}$ ). El tiempo de reacción fue de tres minutos, la actividad enzimática se expresó en  $\text{mmol de superóxido.min}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$  y la actividad específica se expresó en  $\text{mmol de superóxido.min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$ .

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el utilitario Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (versión 17.0 para Windows, SPSS Inc.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El eficiente protocolo de aclimatización empleado fue mejorado con diferencias estadísticas en el porcentaje de supervivencia. Se logró 96 % para las plantas con BioJas®, mientras el control registró cerca de 2 % de más mortalidad.

El efecto del BioJas® en las variables morfológicas de vitroplantas de piña, al inicio de la aclimatización, manifestó solo diferencias favorables en el número de hojas y con igualdad en la masa fresca. Se justifican las reducciones porque el producto duplicó el número de brotes, al parecer potenciando acción de citoquininas. A pesar de eso, no influyó en la vitalidad de las plantas como antes se informó.

Finalmente, las plantas tratadas con BioJas® alcanzaron mejores variables de calidad al concluir la aclimatización. Estas manifestaciones deben corresponderse con cambios en el metabolismo que el tratamiento *in vitro* favoreció, por la aplicación de manejos en los frascos de cultivo antes de la salida de las plantas a exteriores, para atenuar efectos negativos de la transición *in vitro- ex vitro*. En términos de intercambio gaseoso por funcionamiento de estomas asociado con fotosíntesis y transpiración, la tabla 1 así lo demuestra.

**Tabla 1.** Efecto del BioJas® en la eficiencia del uso del agua ( $\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivar MD-2 durante la aclimatización

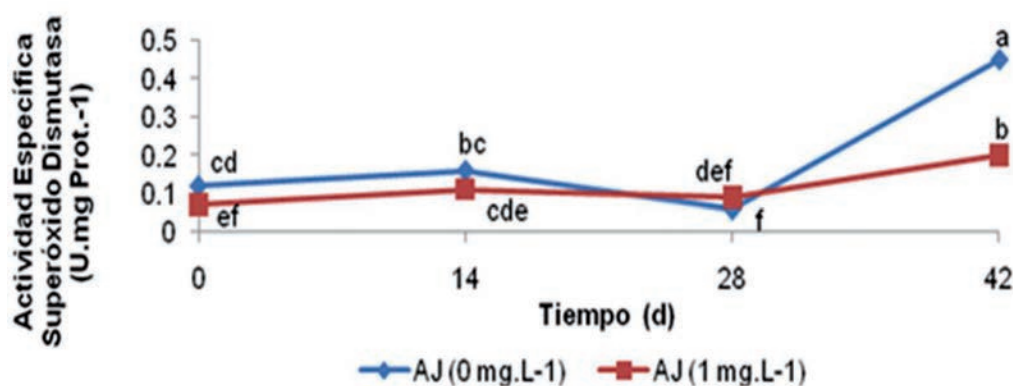
| Concentración BioJas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) | día 0 | día 14 | día 28 | día 42 |
|---------------------------------------------|-------|--------|--------|--------|
| 0                                           | 0.61b | 3.35   | 6.46b  | 14.29  |
| 1                                           | 1.44a | 3.62   | 8.37a  | 14.05  |
| ES                                          | 0.15  | 0.12   | 0.44   | 0.86   |
| Sig.                                        | *     | ns     | *      | ns     |

Medias con letras diferentes indican significación (T-test,  $p \leq 0.05$ ) en cada momento. Cada dato representa la media para  $n=40$ .

La alta eficiencia del uso del agua de las vitroplantas de piña tratadas con el BioJas® en este experimento demuestra que estas tuvieron mayor captación del  $\text{CO}_2$ , con menor pérdida del agua, que significa que su calidad es mejor. En estudios realizados en plantas de *Platymiscium pinnatum* no encontraron ninguna correlación entre la tasa relativa de crecimiento y la eficiencia del uso del agua. En el presente trabajo la tasa de crecimiento de las variables morfológicas fue superior en las plantas con BioJas®, para igualarse al control 42 días después de la salida *in vitro*. Algunos factores que influyeron son: la fotosíntesis no difirió entre los grupos y ascendió de 4 a 7  $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; la transpiración fue mayor en el control en el momento de la salida, luego se redujo de 4 a 1  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  pero el BioJas® siempre mantuvo este indicador bajo, así logró mayor eficiencia del uso

del agua; las clorofilas fueron bajas en las tratadas con BioJas® (100µg.g<sup>-1</sup> MF) pero, de inmediato, en condiciones fotoautotróficas, se igualaron al control y ambos grupos llegaron a 250 µg.g<sup>-1</sup> MF de clorofilas a+b. Esto indica que la mejor supervivencia de las plantas tratadas con BioJas® y con este comportamiento, estuvieron más preparadas para enfrentar el estrés abiótico que implica la transición *in vitro-ex vitro*. La figura 1 expresa con la acción de la superóxido dismutasa sobre las especies reactivas del oxígeno (ERO) contribuye a este análisis.

Los cambios registrados en este indicador están en correspondencia con las concentraciones de proteínas solubles cuantificadas en las plantas y que merecen un estudio proteómico de cada momento. En la fecha del tránsito, las plantas previamente tratadas con BioJas® poseían mayor biosíntesis proteica, expresión de una mejor predisposición metabólica para enfrentar la transición Aragón *et al.* (2), por lo que disminuye la actividad específica de SOD, ya que su actividad enzimática fue similar en ambos tratamientos. Así fue en todo el proceso, salvo a los 28 días, cuando se evaluó un incremento proteico en las control.



**Figura 1.** Efecto del BioJas actividad específica (ES=+0.02 U.mg Prot.<sup>-1</sup>) de la superóxido dismutasa de vitropiantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivar MD-2 en condiciones de aclimatización. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Cada dato representa la media para n=6. Una U corresponde a 1 µmol de superóxido por minuto.

Las bajas generaciones de ERO (presumiblemente O<sup>-2</sup>) en las vitropiantas tratadas con el BioJas® aseguran un buen desarrollo de estas. La mayor tasa de crecimiento de la hoja, órgano vital para el fototropismo vegetal, es una evidencia que apoya este análisis. Mayor producción de ERO puede causar un retraso en el desarrollo de plantas, como se evidenció en plantas transgénicas de papa, con una elevada producción de ERO por la sobreexpresión del gene Cu/Zn SOD cloroplástico Kim *et al.* (3).

## CONCLUSIONES

1. Las vitropiantas de piña tratadas con el BioJas® presentaron alta eficiencia del uso del agua que demuestra mayor captación del CO<sub>2</sub> que incide en una mejor calidad del cultivar.
2. Las plantas previamente tratadas con BioJas® presentaron mayor biosíntesis proteica y mejor predisposición metabólica para enfrentar la transición *in vitro-ex vitro*.
3. La tasa de crecimiento de las variables morfológicas fue superior en las plantas con BioJas® para igualarse al control 42 días después de la salida *in vitro*.
4. Las plantas tratadas con BioJas® tuvieron mejor supervivencia y pudieron estar más preparadas para enfrentar el estrés abiótico que implica la transición *in vitro-ex vitro*.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Bartholomew, D. 2009. MD2 Pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. Pineapple News. 2-5.
2. Aragón, C.E.; Carvalho, L.C.; González- Olmedo, J.L.; Escalona, M. ; Amancio, S. 2009. Sugarcane (*Saccharum sp.* Hybrid) Propagated in Headspace Renovating Systems Shows Autotrophic Characteristics and Develops Improved Anti-oxidative Response. Tropical Plant Biol. 2: 38–50.
3. Kim, H. S; Yoon, S. K.; Hahn, H.K. 2009. Reactive Oxygen Species: Regulation of Plant Growth and Development. Advances in Botanical Research. 52: 26-41.
4. Cernusak, L.A.; Aranda, J.; Marshall, J.D.; Winter, K. 2007. Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. New Phytologist. 173: 294 –305.