

13

Ácido jasmónico como regulador de estrés en vitroplantas de piña cultivar MD-2 en la fase de aclimatización

Jasmonic acid as a stress regulator in pineapple cultivate MD-2 in the acclimatization phase

MSc. Alexander Moreno Herrera¹

E-mail: amoreno@utmachala.edu.ec

MSc. Irán Rodríguez Delgado¹

E-mail: irodriguez@utmachala.edu.ec

Dr. C. Justo Lorenzo González-Olmedo²

E-mail: justo@bioplantas.cu

Ing. Adrián Mangar²

E-mail: adrian@bioplantas.cu

¹ Universidad Técnica de Machala. República del Ecuador.

² Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

Cita sugerida (APA, sexta edición)

Moreno Herrera, A., Rodríguez Delgado, I., Lorenzo González-Olmedo, J., & Mangar, A. (2017). Ácido jasmónico como regulador de estrés en vitroplantas de piña cultivar MD-2 en la fase de aclimatización. *Revista científica Agroecosistemas*, 5 (1), 97-108. Recuperado de <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>

RESUMEN

La investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto del ácido jasmónico en plántulas de piña variedad MD-2, micropropagadas en la fase de aclimatización en relación con parámetros de calidad ante factores estresantes. Para ello se aplicó ácido jasmónico (formulación BioJas®) a una concentración de 1 mg·L⁻¹ y se evaluó su efecto en variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en las hojas. Para detectar diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó la prueba T para muestras independientes y el análisis de varianza de clasificación simple (p-valor<0,05). Los resultados mostraron que el ácido jasmónico atenuó los efectos estresantes en la transición *in vitro-ex vitro* al promover hojas con menor pérdida de agua, menor concentración de clorofila y un proceso fotosintético más eficiente, además permitió la reducción del estrés oxidativo en la aclimatización, asociado con el aumento de la concentración de proteínas solubles y la disminución de la actividad específica de la enzima superóxido dismutasa con mejor calidad de vitroplantas.

Palabras clave:

Adaptación, enzima, ácido jasmónico, micropropagación.

ABSTRACT

The research was carried out with the objective of determining the effect of jasmonic acid on MD-2 variety pineapple seedlings, micropropagated in the acclimatization phase in relation to quality parameters before stressors. For this purpose jasmonic acid (BioJas® formulation) was applied at a concentration of 1 mg·L⁻¹ and its effect on morphological, physiological and biochemical variables in the leaves was evaluated. To detect significant differences between treatments the T-test was applied for independent samples and analysis of variance of simple classification (p-value<0,05). The results showed that the jasmonic acid attenuated the stress effects in the transition *in vitro-ex vitro* to promote leaves with less water loss, lower concentration of chlorophyll and a more efficient photosynthetic process, also allowed the reduction of oxidative stress in acclimatization, associated with increased soluble protein concentration and decreased specific activity of the enzyme superoxide dismutase with better quality of vitroplants.

Keywords:

Adaptation, enzyme, jasmonic acid, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

La piña pertenece a la familia Bromeliaceae, incluye tres grandes sub-familias con 2 974 especies, distribuidas en 56 géneros, muchas de las cuales son epifitas. La producción bruta mundial hasta 2013, demuestra un incremento de 139 853 millones de toneladas. Hasta hace pocos años la producción comercial se basó en el cultivar Cayena lisa pero con la introducción del cultivar MD-2 se revolucionó la industria de la piña (Bartholomew, 2009). Este cultivar es una planta vigorosa, resistente a las plagas, alto rendimiento, buena calidad de fruto, un color de oro intenso del exterior del fruto, más sólidos solubles que Cayena lisa, bajo contenido de acidez especialmente en la época de invierno, alto contenido de vitamina C y una larga vida poscosecha.

La variedad MD-2, es de gran importancia a escala mundial, como resultado de programas locales de siembra, se estima que hasta 2020 se destine a su cultivo unas 2 500 hectáreas, lo cual contribuirá a acrecentar los contratos comerciales internacionales y los mercados internos y externos, debido a que todavía se producen frutas que no cumplen los requerimientos exportables. Esta necesidad de incrementar su producción requiere una alta densidad de plantación en un mundo donde el área de tierra cultivable es limitada.

La piña se siembra con altas densidades (35 mil-75 mil plantas ha⁻¹), lo que limita la cantidad de propágulos para satisfacer las demandas de las plantaciones, sin embargo, la micropropagación puede resolver este problema.

Según González-Olmedo, et al. (2005), la tecnología de micropropagación es una herramienta eficaz, con muchas ventajas sobre la técnica tradicional de propagación vegetal, por permitir la obtención de un gran número de vitroplantas en poco tiempo y con mejor calidad. En dos años se puede alcanzar, en piña, hasta un millón de vitroplántas por simple yema axilar (Pannetier & Fruits, 1976). Sin embargo, esta técnica posee varios problemas especialmente en el tránsito de las plántulas de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Fila, Ghashghaie, Hoarau & Cornic (1998), demostraron que plántulas de diferentes especies en la fase de aclimatización presentan baja actividad fotosintética, anomalías anatómicas y excesiva pérdida de agua, de no mantenerse una humedad alta en el ambiente.

El estrés que sufren las plantas en la fase de aclimatización se podría mejorar con la aplicación del Ácido Jasmónico (AJ), compuesto que es parte de la familia de los jasmonatos, fitohormonas lipídicas, derivados oxigenados de los ácidos grasos linoleico

y linolénico, principalmente, los cuales actúan como moléculas señalizadoras de las plantas a numerosas situaciones de estrés (Rojo, 1999; Ziqiang, 2014). Los jasmonatos intervienen en el crecimiento y desarrollo e influyen en el intercambio de las plantas con el ambiente (Santner & Estelle, 2009). Impacta en una serie de procesos que incluyen la respuesta al estrés biótico y abiótico en acción activadora, inhibidora o degradativa en la célula vegetal que permite la eficiencia fisiológica (Khan, Rozhon & Poppenberger, 2014).

Los indicadores morfológicos son importantes en la calidad de plantas porque es el resultado de eficiencia fisiológica, capacidad de interacción planta-ambiente y nivel de resiliencia alcanzada en momentos de tránsito por ambientes creados que permiten desarrollar capacidad a la planta e incrementar su supervivencia en el ambiente *in vivo*.

Los jasmonatos durante la maduración del melocotón, en especial el jasmónico de metilo (MeJA) retrasa el ablandamiento de la fruta a través de las actividades de las enzimas de la pared celular de regulación de celulosa, además aumentó en frutas su efecto anti-estrés, debido a la promoción de actividades enzimáticas como la superóxido dismutasa (SOD) y redujo el contenido de etileno endógeno de las frutas y disminuyó la acidez que origina la maduración de los frutos (Wei, Wen & Tang, 2017).

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del AJ en plántulas de piña variedad MD-2, micropropagadas en la fase de aclimatización en relación con parámetros de calidad ante factores estresantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en áreas de aclimatización y en los laboratorios especializados del Centro de Bioplasmas, en la Universidad de Ciego de Ávila "Máximo Gómez Báez", de Cuba, durante un período comprendido entre los meses de noviembre y enero de 2010-2011.

Se empleó como material de estudio las vitroplantas de piña variedad MD-2 micropropagadas según el protocolo propuesto por Daquinta (1998). Las yemas de corona se emplearon como explante, después de desinfección con hipoclorito de sodio. El protocolo se aplicó hasta 10 subcultivos. En la fase de enraizamiento y elongación el medio de cultivo se dividió en dos grupos, donde a uno se le añadió el AJ 1 mg·L⁻¹ y el otro la misma cantidad de agua destilada que sirvió como control.

La utilización de AJ a dosis de 1 mg·L⁻¹ obedece a los resultados previamente logrados por González-Olmedo, Escalona, Cid, Pina & Rodríguez (2002).

Este producto es considerado un regulador del crecimiento vegetal endógeno del tipo de las abscisinas, fue obtenido mediante el procedimiento tecnológico de tipo bioproducto (BioJas®) rico en AJ (Sánchez & michelena, 2014).

Cultivo in vitro

En las condiciones de cultivo *in vitro*, todas las manipulaciones se realizaron en medios asépticos. Los medios de cultivos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 118 kPa de presión de acuerdo al volumen del medio. Previa la esterilización, el pH del medio se ajustó a 5,7 en las fases del cultivo *in vitro*. Las vitroplantas fueron cultivadas en magentas plásticas transparentes (7,2 cm de diámetro inferior, 8,6 cm de diámetro superior y 9,2 cm de altura), con un volumen de 40 mL de medio líquido en cada una. Las cámaras de cultivo se caracterizaron por tener una luz artificial con un flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF) de 40-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$ durante todas las fases.

Aclimatación

Las plantas provenientes de la última fase de *in vitro* (enraizamiento), fueron aclimatadas en el Centro de Bioplantas. Para esta etapa, las mismas deben ser consideradas competentes por tener una altura ≥ 4 cm (Daquinta & Benegas, 1997).

Los dos grupos de vitroplantas (provenientes del medio sin ácido jasmónico (control) y del medio con el AJ fueron sembrados en recipientes plásticos ($V\approx 190\text{ cm}^3$) con sustrato compuesto por una mezcla de zeolita+cachaza 1:1 (v:v). Las casas de cultivo mantuvieron una temperatura promedio según mediciones realizadas en el periodo de evaluación de las plantas de piña durante 42 días de $25\pm 2^\circ\text{C}$, una humedad relativa de 60-70%, así como condiciones atmosféricas de concentración de CO_2 ($375\text{-}400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y de régimen de foto período luz oscuridad correspondientes a los ciclos naturales. Todas las mediciones ambientales se realizaron con un equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6).

Las plantas provenientes de la fase de enraizamiento, antes de ser climatizadas, fueron categorizadas según sus tamaños en pequeñas, medianas y grandes. La proporción de plantas pequeñas, medianas y grandes fue de 8,9%, 51,1% y 40,0% para el control y de 22,2%, 56,7% y 21,1% para el grupo tratado con el AJ, respectivamente. La misma proporción fue tomada en cuenta durante la toma de material

vegetal (hojas) para las evaluaciones fisiológicas y bioquímicas.

En un primer experimento se determinó el efecto del ácido jasmónico en aspectos morfológicos de vitroplantas en la transición *in vitro-ex vitro* y en condiciones de aclimatación, para lo cual se utilizó la concentración del AJ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

En el inicio de la fase de aclimatación, se evaluaron las variables morfológicas: altura de la planta (AP) en cm, número de hojas (NH), longitud de la hoja mayor (LHM) en cm, número de raíces (NR), longitud de raíz mayor (cm) y masa fresca (MF) en g. Al final de la aclimatización se evaluó la longitud de hoja mayor (cm) de las vitroplantas, como indicador muy importante que utilizado en los laboratorios comerciales para la selección de plantas y sirve de referencia a otras variables. Las mediciones se realizaron con una regla graduada de una precisión hasta un lugar decimal y la MF se cuantificó con balanza analítica con una precisión de cuatro lugares decimales.

En un segundo experimento fueron determinados los efectos del AJ en los aspectos bioquímicos y fisiológicos de las vitroplantas de aclimatación. Las variables bioquímicas y fisiológicas se determinaron a los 0, 14, 28 y 42 días de su permanencia en las condiciones de aclimatización, tomando las hojas más representativas en consideración de la categorización.

Para la determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b), se tomó una hoja de seis plantas por tratamiento (siempre respetando el criterio de la categorización de las plantas). Para 0,2 g de hojas maceradas en nitrógeno líquido, se añadió 1 mL de acetona al 80 %. La mezcla se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos y se leyó en la absorbancia de 645 nm y 663 nm. Se procedió a calcular las concentraciones de clorofilas a, b y totales ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) según lo descrito por Porra (2002).

Las evaluaciones fisiológicas se realizaron en el inicio de la fase de aclimatación, o sea en el día 0 y posteriormente a los 14, 28 y 42 días. Como indicadores de variables fisiológicas se midieron la fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) y la transpiración total ($\text{mmol H}_2\text{O}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$). Las mediciones de estas variables se realizaron con el equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6 de $2,5\text{ cm}^2$). El área de la cubeta se cubrió con dos hojas como mínimo ($2,5\text{ cm}^2$) y estas fueron evaluadas a la luz óptima donde la fotosíntesis fuera máxima y estable (FFF de $600\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$). La concentración de dióxido de carbono y la humedad relativa fueron valores ambientales, $375\text{-}400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y 80-90%, respectivamente.

Las mediciones se realizaron entre las 9:00 y 10:00 horas.

Las extracciones enzimáticas y de proteínas solubles se realizaron a través del mismo procedimiento. A 0,25 g de hojas se añadió tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, que contenía 0,1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mM PMSF y 15 mM ME, en una relación (1:4) (p:v); además se agregó al medio 10% de PVPP respecto al peso fresco. La suspensión se homogenizó en un mortero y se centrifugó a 15 000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se colectó utilizándose como extracto enzimático crudo para cuantificar la concentración de proteínas solubles. Todas las operaciones de extracción se realizaron a 4°C. La cuantificación de la concentración de proteínas solubles se realizó por el método de Bradford (1976), y se expresó en µg·g⁻¹ de masa fresca referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA).

Para la determinación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1), primaria en la eliminación de radicales superóxido, se utilizó una mezcla que contenía 20 µL de extracto enzimático, 1 mL de tampón fosfato de potasio-KOH 50 mmol L⁻¹, pH 7.6, 0.1 mmol L⁻¹ EDTA, 0.01 mmol L⁻¹ citocromo C, 0,05 mmol L⁻¹ xantina, 0,03 unidades xantina oxidasa (EC 1.2.3.22) (SIGMA). La mezcla xantina-xantina oxidasa se utilizó como fuente de radicales superóxido y se aplicó el método del citocromo C (550 nm) (coeficiente de extinción 340=21.1 (mmol L⁻¹·1cm⁻¹) (McCord & Fridovich, 1969). El tiempo de reacción fue de cinco minutos, la actividad enzimática se expresó en mmol de superóxido min⁻¹ y la actividad específica se expresó en mmol de superóxido min⁻¹ y µg·Prot.⁻¹.

Procedimiento estadístico

Para las variables morfológicas se aplicó la prueba de T para muestras independientes para un p-valor<0,05. Para los datos obtenidos en los demás experimentos se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple, después de transformados los datos en los casos necesarios y prueba de rangos múltiples de Tukey (p-valor<0,05). Para el procesamiento de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22 de prueba para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Indicadores morfológicos

El resultado obtenido muestra, para variables morfológicas en vitroplantas de piña variedad MD-2 en la transición *in vitro-ex vitro* y en condiciones de aclimatación, diferencias significativas excepto en la masa fresca. El tratamiento con ácido jasmónico (1 mg·L⁻¹) al compararlo con el control (0 mg·L⁻¹ de AJ) mostró menores valores en la altura, longitud de la hoja mayor, número

de raíces y mayor longitud de raíz mayor; sin embargo, provocó mayor número de hojas, las cuales son importantes para el desarrollo de las plantas, ya que son los órganos responsables de la fotosíntesis, incluso más hojas fotosintéticamente activas implican más fotosíntesis neta (tabla 1).

Tabla 1. Efecto del ácido jasmónico en variables morfológicas al inicio de la aclimatación.

Concentración de AJ (mg·L ⁻¹)*	Altura (cm)	Número de hojas	Longitud de hoja mayor (cm)	Número de raíces	Longitud de raíz mayor (cm)	Masa fresca (g)
0	8,51a	11,30b	7,64a	7,54a	4,56a	2,25
1	7,96b	11,84a	7,07b	5,59b	3,11b	2,14
ES	0,09	0,13	0,09	0,23	0,12	0,04
Sig.	*	*	*	*	*	ns

*Medias con letras diferentes indican diferencia significativa dentro de cada columna para p-valor<0,05 (n=90). ES=Error estándar. Sig.= Significancia. ns=No significativo.

La incidencia del AJ en la reducción de la longitud de la hoja mayor influyó notablemente en reducción de la altura de las plantas estudiadas. La igualdad de las variables sobre MF de ambos grupos experimentales contrasta con otros indicadores morfológicos evaluados. La compensación de los incrementos y descensos entre las otras cinco variables, todas involucradas en aporte a la masa fresca de las plantas evaluadas, puede explicar la equidad registrada en esta última. La masa seca que aportaría al análisis y más seleccionada con la formación de estructuras, puede ser objeto de análisis en los protocolos de aclimatación.

A causa del comportamiento de las plantas tratadas con AJ, en las cuales cinco de los seis indicadores morfológicos fueron inferiores al grupo control, debe considerarse su influencia sobre la supervivencia tránsito *in vitro-ex vitro*. Todas las evaluaciones realizadas cada siete días, durante los 42 días del experimento, demostraron que el 94% de las plantas control y 96% de las plantas tratadas sobrevivieron, lo que indica que las disminuciones morfológicas analizadas no tuvieron implicaciones letales. Los incrementos significativos que las plantas tratadas registraron en la longitud de su hoja mayor demuestran los efectos favorables del AJ, expresados durante la aclimatación. El resultado a los 42 días indicó que las plantas expuestas a AJ mostraron mejor efecto sobre la longitud de la hoja mayor (figura 1).

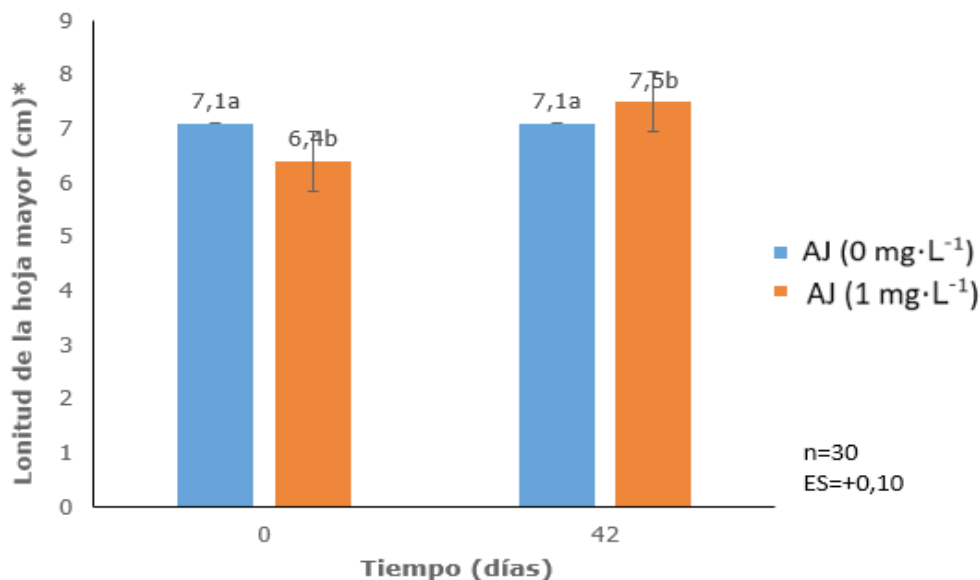


Figura 1. Efecto del ácido jasmónico en la longitud de la hoja mayor de vitroplantas de piña en condiciones de aclimatación. *Letras diferentes indican diferencia significativa para las concentraciones de AJ en los momentos evaluados dentro del proceso de aclimatación (p -valor $<0,05$).

El AJ reduce la tasa de crecimiento de las raíces de *Arabidopsis* por una reducción del tamaño de células y actividad meristemática, permitiendo inhibir el crecimiento y formación de raíces laterales cuando se utilizó AJ (Wasternack & Hause, 2013).

El AJ desempeñó un papel importante en la modificación de la morfología de las plantas en respuesta a diferentes situaciones de estrés (Wasternack & Hause, 2013) lo que quedó en evidencia en el análisis integral de los resultados de este trabajo, obtenidos tras la evaluación de los sistemas foliar y radical.

Las manifestaciones observadas en la figura 1 deben corresponderse con cambios en el metabolismo, favorecidos por el manejo *in vitro*, en el caso de otras especies como plátano y caña de azúcar (Aragón, Carvalho, Olmedo, Escalona & Amancio., 2009b;

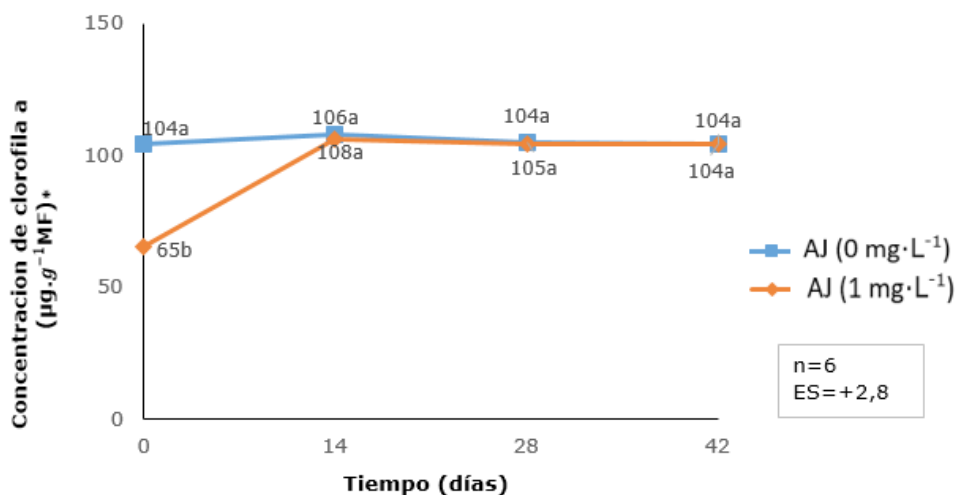
Aragón, et al, 2009a); demostraron que una mejor preparación metabólica de las vitroplantas mejora la transición *in vitro-ex vitro*.

De considerar este indicador morfológico como referente de crecimiento se comprobó de modo cuantitativo la apreciación visual de la mejor calidad que finalmente alcanzaron las plantas tratadas con AJ de concluir la fase de aclimatación en casas de cultivo.

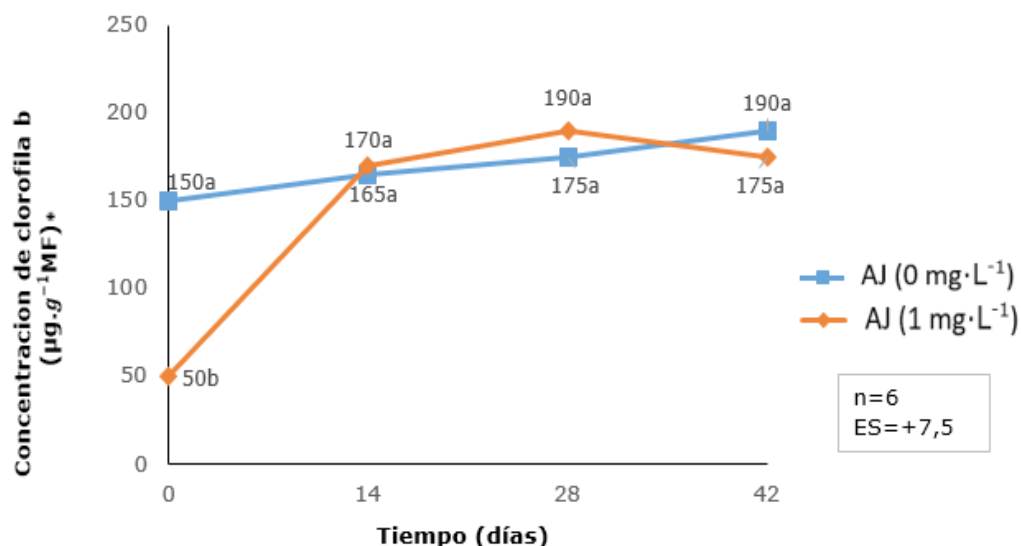
Aspectos bioquímicos y fisiológicos

Los pigmentos fotosintéticos intervienen más directamente en el proceso de absorción y conversión de la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis. En la figura 2, se muestra la concentración de clorofilas a, b y totales respectivamente.

(A)



(B)



(C)

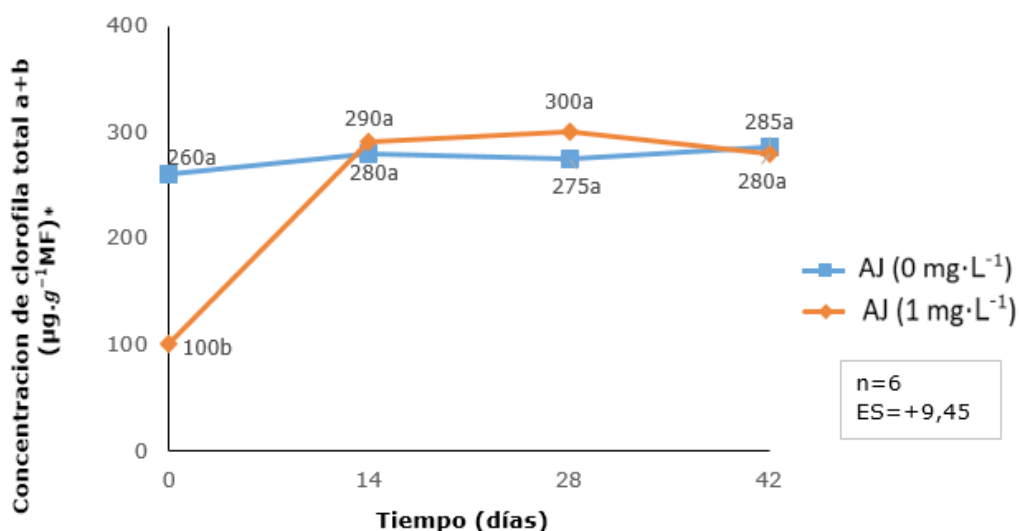


Figura 2. Efecto del AJ en concentración de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total a + b (C) en plantas de piña en condiciones de aclimatación.

*Letras diferentes difieren estadísticamente en cada momento evaluado dentro del proceso de aclimatación (p-valor<0,05).

Se evidencia que al inicio de la aclimatación hubo diferencia significativa entre el control y el AJ, mientras que desde los 14 hasta los 42 días los resultados no mostraron diferencias significativas. Previamente Ananiev & Ananieva (2004); y Ataei, Moradi & Akbarpour (2013), demostraron que el AJ tiene un efecto inhibitorio en la acumulación de clorofila, lo cual se debe a su efecto directo en las reacciones oscuras de la vía de síntesis de este pigmento. Los resultados mostrados muestran una efectiva recuperación de un compuesto vital en la dinámica de crecimiento de las plantas que, en condiciones de cultivo *in vitro*, mantienen esencialmente un crecimiento mixotrófico muy cercano al heterotrofismo

(González-Olmedo, et al., 2005). La síntesis de clorofila es una condición indispensable para que en los ambientes *ex vitro* se alcance con la mayor celeridad posible el crecimiento fotoautotrófico, condición requerida para la supervivencia de las plantas.

Fotosíntesis neta y transpiración total

No se observan diferencias significativas en la fotosíntesis neta en ninguno de los cuatro momentos evaluados en este experimento entre ambos grupos de plantas, aunque a partir del día 14 la actividad fotosintética aumentó con respecto a la evaluada en el momento de la salida de los frascos (figura 3).

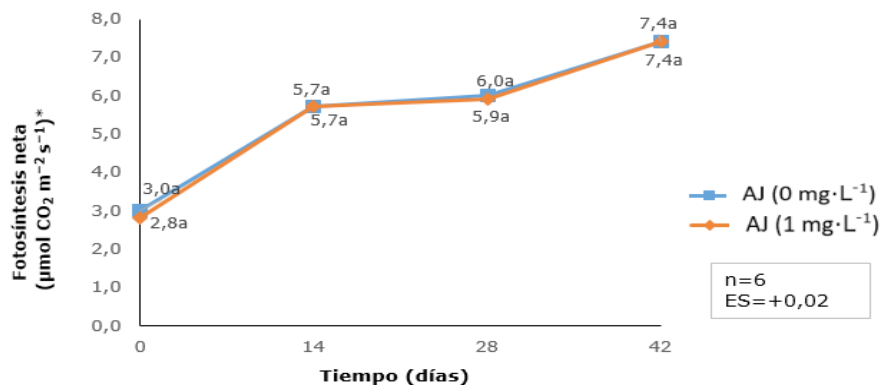


Figura 3. Efecto del AJ en la fotosíntesis neta de vitroplantas de piña en condiciones de aclimatación.

*Letras diferentes difieren estadísticamente en cada momento evaluado dentro del proceso de aclimatación (p -valor $<0,05$).

Los resultados obtenidos muestran incremento de la actividad fotosintética en correspondencia con el tiempo de tratadas las plantas con AJ; no así los contenidos de clorofilas que se mantuvieron semejantes y sin diferir del testigo en condiciones de aclimatación, por lo que se infiere que las concentraciones empleadas pueden influir en la activación de estos procesos fotosintéticos.

Ananieva & Ananiev (1999) demostraron que el AJ pueden influir en el proceso de fotosíntesis con la disminución de la tasa de fijación fotosintética de CO₂ y la actividad de la carboxilasa RuBP.

El comportamiento de las plántulas tratadas con el AJ al inicio de la aclimatación puede relacionarse con el funcionamiento y estructura de complejos pigmento-proteína denominados antenas, "cosechadores" de luz (light harvesting complexes), los cuales funcionan como catalizadores en la obtención de energía lumínica y en funciones de fotoprotección y fotoinhibición (Shan, et al., 2011). Todo esto, unido a la menor transpiración, hizo que las plántulas con el AJ realizaran su fotosíntesis con mayor eficiencia principalmente al inicio de la

aclimatación que es un momento crítico del proceso. Otros elementos bioquímicos, como los involucrados en el metabolismo de especies reactivas del oxígeno, pueden brindar más información de la predisposición de estas plantas tratadas con AJ y efectos antiestresantes.

El AJ disminuyó la transpiración total de las plantas al inicio de aclimatación (figura 4), aunque presentaron mayor número de hojas (tabla 1). Esto presupone mejor manejo estomático inducido por el AJ tal como previamente lo informaron para otras formulaciones de AJ y jasmonatos (Creelman & Mullet, 1997; Dombrowski & Bergey, 2007). Después de la transferencia a condiciones *ex vitro* las plántulas tienen que modificar cualquier anomalía (anatómica y fisiológica) originada por el cultivo *in vitro*. Entre los cambios necesarios se encuentra la forma del estoma (de circular a elíptica) y el desarrollo de las ceras cuticular y epicuticular como cambios en la anatomía foliar. La reducción de la densidad de los estomas e inversamente el aumento de la densidad de tricomas, especialmente en el lado abaxial de las hojas (Chaari-Rkhis, Maalej, Chelli-Chaaboun, Fki & Drira, 2015) favorece estos procesos.

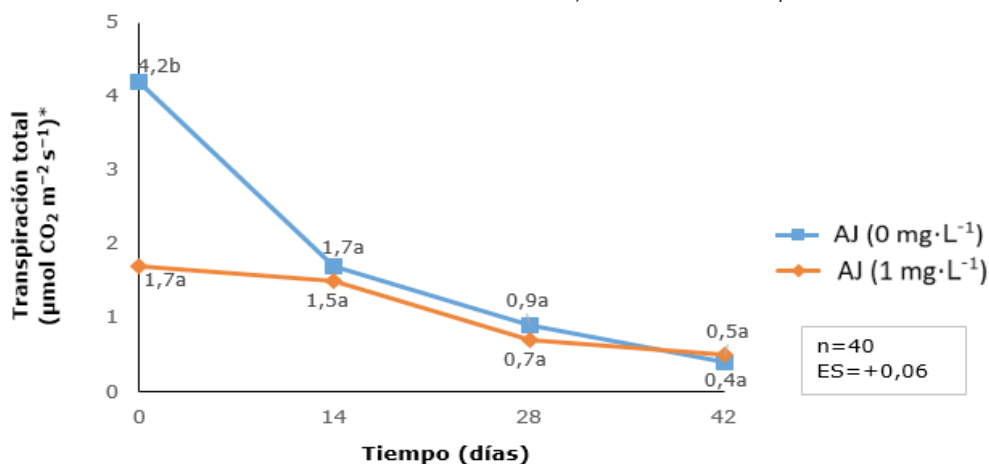


Figura 4. Efecto del AJ en la transpiración total de vitroplantas de piña en condiciones de aclimatación.

*Letras diferentes difieren estadísticamente en cada momento evaluado dentro del proceso de aclimatación (p -valor $<0,05$).

Nuevamente a partir de la evaluación realizada el día 14, la variable transpiración se igualó en ambos grupos experimentales de plantas, con una disminución significativa para las plantas control. Los descensos registrados en las siguientes evaluaciones demuestran la eficiencia de la metodología de aclimatación empleada para reducir pérdida de agua, asociado a la realización del proceso de fotosíntesis.

La pérdida de agua desde los órganos aéreos de la planta en forma de vapor se conoce como transpiración y es una consecuencia natural de las características anatómicas fundamentales de la planta. El AJ demostró su efecto de control de este parámetro desde los primeros momentos en el período de evaluación.

Actividad enzimática, contenido de proteínas solubles y actividad específica de la superóxido dismutasa

La transición *in vitro*–*ex vitro* provoca un estrés abiótico en las plantas, como respuesta producen especies reactivas de oxígeno, las cuales en concentraciones altas provocan anomalías y en caso extremo la muerte de las células. La enzima superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno. Con la ayuda de otras enzimas reduce el anión superóxido hasta forma agua.

Al evaluar los resultados del AJ sobre la actividad enzimática (figura 5), resulta que entre ambos grupos experimentales no existió diferencia en la actividad enzimática de la SOD en ninguno de los cuatro momentos evaluados. Sin embargo, a diferencia de las plantas control en las que nunca varió la actividad de esta enzima, en las plantas tratadas con AJ ésta se incrementó durante los primeros 14 días.

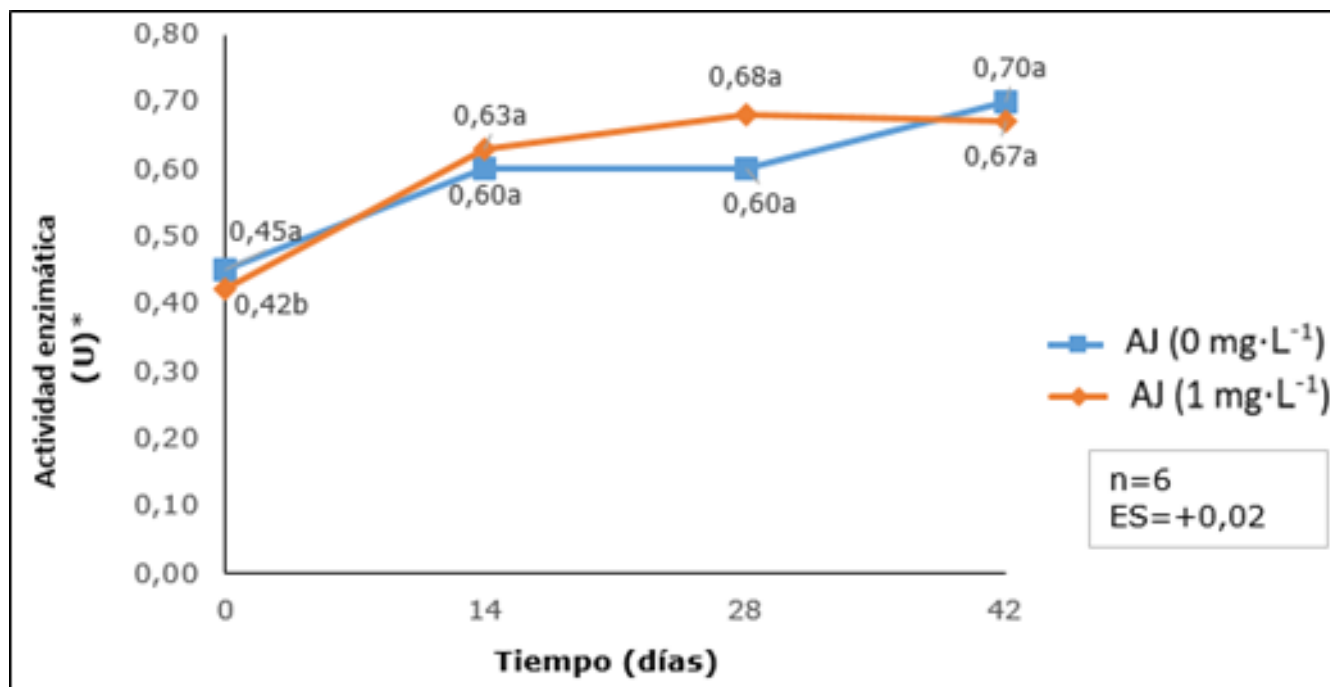


Figura 5. Efecto del AJ sobre la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en condiciones de aclimatación.

*Letras diferentes difieren estadísticamente en cada momento evaluado dentro del proceso de aclimatación (p -valor $<0,05$). Una U corresponde a 1 μ mol de superóxido por minuto.

En ese período del experimento las plantas tratadas con AJ superan en concentración de proteínas solubles a aquellas que se utilizaron como control, aunque no se presentaron diferencias estadísticas significativas en los momentos de evaluación, excepto la tercera realizada el día 28 del experimento que

fue superior en las plantas utilizadas como testigo (figura 6).

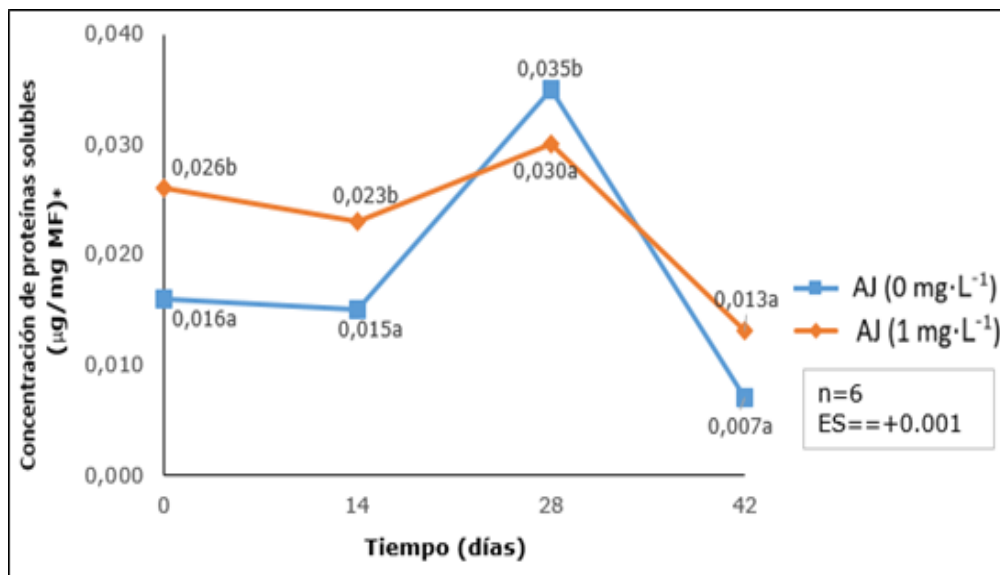


Figura 6. Efecto del AJ sobre la concentración de proteínas solubles en condiciones de aclimatación.

*Letras diferentes difieren estadísticamente en cada momento evaluado dentro del proceso de aclimatación (p-valor<0,05).

Los cambios registrados en la actividad específica de la enzima SOD se encuentran en correspondencia con las concentraciones de proteínas solubles cuantificadas en las plantas y que merecen un estudio proteómico del momento del tránsito. Las plantas previamente tratadas con AJ poseían mayor biosíntesis proteica, asociada con la mejor predisposición metabólica para enfrentar la transición (Aragón, Carvalho, Olmedo, Escalona & Amancio, 2009b) lo cual disminuye la actividad en relación con este indicador.

Como consecuencia de los comportamientos analizados anteriormente, la actividad específica de la enzima SOD también presentó variaciones. Al finalizar la aclimatación (42 días) se aprecia reducción de la capacidad metabólica y tasa de crecimiento entre otras razones por agotamiento del sustrato, la actividad específica de SOD se incrementó, aunque en las plantas control ocurrió un incremento de la actividad enzimática y menor concentración de proteínas. Esta es una evidencia importante de los efectos antiestresantes inducidas por AJ (figura 7).

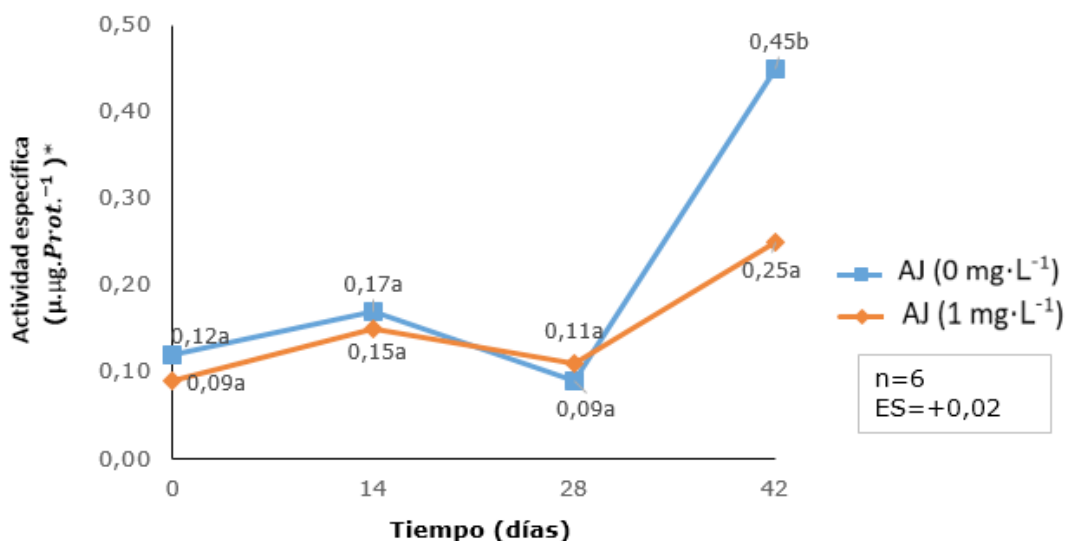


Figura 7. Efecto del AJ sobre la actividad específica de la superóxido dismutasa en condiciones de aclimatación.

*Letras diferentes difieren estadísticamente en cada momento evaluado dentro del proceso de aclimatación (p-valor<0,05).

CONCLUSIONES

Las variables morfológicas (altura, número de hojas, longitud de la hoja mayor, número de raíces y longitud de raíz mayor) mostraron diferencias significativas entre el tratamiento con AJ y el control al inicio de la aclimatación, aunque para la masa fresca no se presentaron. Sin embargo, a los 42 días las plántulas expuestas al AJ mostraron mejor efecto sobre la longitud de la hoja mayor al alcanzar 0,4 cm de incremento como promedio en relación al tratamiento control.

Los resultados mostraron que el ácido jasmónico atenuó los efectos estresantes de la transición *in vitro-ex vitro* al promover hojas con menor pérdida de agua, menor concentración de clorofila y un proceso fotosintético más eficiente, además permitió la reducción del estrés oxidativo en la aclimatización, asociado con el aumento de la concentración de proteínas solubles y la disminución de la actividad específica de la enzima superóxido dismutasa con mejor calidad de vitroplantas.

Las plántulas tratadas con AJ mostraron menor transpiración, lo cual permitió que realizaran su fotosíntesis con mayor eficiencia principalmente al inicio de la aclimatización que es un momento crítico del proceso. La actividad específica de SOD fue mayor en las plantas control porque tenían el mayor valor de actividad enzimática y la menor concentración de proteínas, siendo evidente los efectos antiestresantes inducidos por AJ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ananiev, E., & Ananieva, K. (2004). Effect of methyl ester of jasmónico acid, abscisic acid and benzyladenine on chlorophyll synthesis in excised cotyledons of cucurbita pepo (zucchini). *Plant physiol*, 30(1), 51-63.

Ananieva, K. I., & Ananiev, E. D. (1999). Effect of methyl ester of jasmónico acid and benzylaminopurine on growth and protein profile of excised cotyledons of Cucurbita pepo L. (zucchini). *Biol. Plant.*, 42(4), 549– 557.

Aragón, C. E., Carvalho, L. C., Olmedo, J. L., Escalona, M., & Amancio, S. (2009b). Sugarcane (Saccharum sp. Hybrid) Propagated in Headspace Renovating Systems Shows Autotrophic Characteristics and Develops Improved Anti-oxidative Response. *Tropical Plant Biol*, 2(1), 38-50.

Aragón, C. E., Escalona, M., Rodríguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., & González-Olmedo, J. L. (2009a). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant*, 46(1), 89-94.

Ataei, N., Moradi, H., & Akbarpour, V. (2013). Growth Parameters and Photosynthetic Pigments of Marigold under Stress Induced by Jasmonic Acid. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(4), 513-517.

Bartholomew, D. (2009). MD-2 Pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. *Pineapple News*, 16(8), 2-5.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* (72), 248–254.

Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Chelli-Chaaboun, A., Fki, L., & Drira, N. (2015). Photosynthesis parameters during acclimatization of in vitro-grown olive plantlets. *Photosynthetica*, 53(4), 613–616.

Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, (48), 355-381.

Daquinta, M. (1998). *Propagación in vitro de la piña (Ananas comosus (L.) Merr.) cultivar MD-2*. (Tesis Doctoral). Centro de Bioplasmas de la Universidad Ciego de Avila, Cuba.

Daquinta, M., & Benegas, R. (1997). Review of tissue culture of pineapple. *Pineapple News*(3), 7-9.

Dombrowski, J., & Bergey, D. (2007). Calcium ions enhance system activity and play an integral role in the wound response. *Plant Science*(172), 335-44.

Fila, G., Ghashghaie, J., Hoarau, J., & Cornic, G. (1998). Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiologia Plantarum*(102), 411– 418.

González-Olmedo, J. L., Escalona, M., Cid, M., Pina, D., & Rodríguez, R. (2002). Bioproductos en la aclimatización de plántulas de la caña de azúcar. *La Habana: Ed. ICIDCA*.

González-Olmedo, J. L., Fundora, Z., Molina, L. A., Abdounour, J., Desjardins, Y., & Escalona, M. (2005). New contributions to propagation of pineapple (Ananas comosus (L.) Merr.) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant*,(41), 87–90.

Khan, M., Rozhon, W., & Poppenberge, B. (2014). The Role of Hormones in the Aging of Plants-a mini-review. *Gerontology*, 60(1), 49-55.

McCord, J., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal Of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-55.

Pannetier, C., & Lanaud, C. (1976). Divers aspects de l'utilisation possible de cultures in vitro pour la multiplication végétative de l'Ananas. *Fruits*, 31(12), 739-750.

- Porra, R. (2002). Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae. *Scheer H (ed) Chlorophylls*, (pp.31-57). London: CRC Press.
- Rojó E, L. J.-S. (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 20(2), 135–142.
- Sánchez, E., & michelena, G. (2014). Procedimiento tecnológico para obtener un bioproducto de ácido jasmónico para uso agrícola. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 4 (2).
- Santner, A., & Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459(7250), 1071–1078.
- Shan, X., Wang, J., Chua, L., Jiang, D., Peng, W., & Xie, D. (2011). The role of *Arabidopsis* rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence. *Plant Physiology*, 155, 751-764.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *review in Annals of Botany*, 111 (6), 1021-1058.
- Wei, J., Wen, X., & Tang, L. (2017). Effect of methyl jasmonic acid on peach fruit ripening progress. *Scientia Horticulturae*, 220, 206-213.
- Ziqiang Z. (2014). Molecular basis for jasmonate and ethylene signal interactions in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65(20), 573–574.