

# **Implicación del metabolismo poliamina etileno en el proceso de inducción floral de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) cv. Cayena lisa bajo la acción del Ethrel 480 (ácido 2 cloroethyl fosfónico) en condiciones inductivas no favorables de verano.**

**Maita Ávila<sup>1</sup>, Juan Valdez<sup>3</sup>, Yermai Esquivel<sup>3</sup>, María A. Blanco<sup>2</sup>, Nadina Nieves<sup>2</sup> Justo L González<sup>2</sup>.**

**1 Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9 CP. 69450. Cuba. 2 Centro de Bioplantas. UNICA Carretera a Morón Km 9 CP. 69450. Cuba. 3 Universidad Nacional Escuela de Química Costa Rica.**

## **Introducción.**

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina son compuestos nitrogenados alifáticos que actualmente se consideran como reguladores del crecimiento y desarrollo de plantas por su efecto demostrado sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular a bajas concentraciones. Por su carácter policatiónico pueden unirse a moléculas cargadas negativamente tales como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos, alterando la expresión génica y la actividad de ciertos enzimas, así como variando la fluidez y la permeabilidad de las membranas biológicas. En algún caso, las poliaminas actúan como reserva de nitrógeno, constituyendo la única fuente del mismo. Su biosíntesis está muy relacionada con la de la fitohormona gaseosa etileno, ya que la S-adenosilmetionina es el intermediario común de ambas rutas metabólicas, por tal motivo trasciende la importancia de su conocimiento en el proceso de inducción floral de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) al estar determinado por altos niveles de etileno endógeno. Este proceso actualmente se lleva a cabo mediante la aplicación de productos comerciales que posibilitan la liberación de etileno y con ello obtener altos porcentajes de floración y de forma homogénea, esto permite programar la producción de acuerdo a las necesidades del mercado incrementando los beneficios a los productores. Sin embargo poco se conoce sobre la relación entre el metabolismo de las poliaminas y el etileno en el cultivo de la piña, por lo que una caracterización del metabolismo poliamina etileno en el proceso de inducción floral de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) cv. Cayena lisa obtenidas por cultivo *in Vitro* bajo la acción del Ethrel 480 (ácido 2 cloroethyl fosfónico) en condiciones inductivas no favorables de verano posibilitaría explicar el proceso de inducción floral, y contribuiría a manejar con mayor efectividad el empleo de reguladores del crecimiento en plantas de piña cv. Cayena lisa y así aumentar los porcentajes de floración.

## **Materiales y Métodos.**

La investigación se realizó en dos fases una de campo y otra de laboratorio. La primera fase consistió en la aplicación del Ethrel 480 (ácido 2- cloroetil fosfónico) a razón de 350 mg L<sup>-1</sup> con doble aplicación en el verano (condiciones inductivas no favorables), mientras que la segunda consistió en la determinación de las variables bioquímicas en estudio.

La fase de laboratorio se realizó en el Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila Cuba y la Universidad Nacional de Costa Rica; ella consistió en la caracterización de los indicadores bioquímicos asociados al proceso de inducción floral.

Como material vegetal se utilizó plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. Cayena lisa con 12 meses de edad. Las plantas contaban con una masa promedio de la hoja "D" de 80g.

Las aspersiones (aplicaciones) se realizaron en horas de la madrugada logrando una entrega de 50mL/planta de solución final, se utilizó para ello una asperjadora manual, a los

tratamientos se le agregó como coadyuvante urea al 2 % de y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) al 0.5 % regulando el pH entre 8-9.

En cada caso se tomaron tres plantas por tratamiento con una frecuencia de 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas. De ellas se tomaron las fracciones de aproximadamente 2 cm. del ápice del tallo a partir de la unión de éste con las hojas más cercanas a la porción apical o yema Terminal. Estos segmentos se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido, luego se procedió a realizar un *pool* con las tres muestras por tratamiento, a partir de lo cual se prosiguió según la variable a estudiar.

Se determinaron los contenidos de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y etileno.

Los indicadores bioquímicos analizados en el trabajo se expresan como las diferencias entre el momento base del montaje del experimento y cada uno de los momentos de interés durante el proceso de inducción floral.

### Determinación de poliaminas libres.

La extracción y determinación de poliaminas libres (putrescina, espermina y espermidina) se realizó según la técnica descrita por Flores y Galston (1982). Se utilizaron 0,5 g de tejido (yemas) se aplicó una solución de  $\text{HClO}_4$  (5 %) frío durante una hora en baño de hielo. Luego las muestras se centrifugan a 48000 rpm durante veinte minutos a 4 °C y el contenido de poliaminas libres del sobrenadante se determinaron después de la benzoilación con cloruro de benzoilo, por HPLC en fase reserva con una columna C-18 de 4.6x250mm de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partículas y eluidas con  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (64 %) a razón de flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Las poliaminas benzoiladas fueron detectadas a 254 nm a una sensibilidad de 0,05 unidades de absorbancia a escala completa. La respuesta fue lineal para una concentración de la mezcla de poliaminas desde 0.1-1  $\text{mol L}^{-1}$ . Como estándar interno se utilizó Diaminoheptano, el cual fue aplicado en la mezcla de patrones y las muestras en el momento de la venzoilación. En cada inyección se aplicó 20  $\mu\text{l}$  de la muestra.

### Determinación de la producción de etileno.

Se tomaron 2g de tejido (yemas) que se colocaron inmediatamente en un *vacutainer* de 10 mL de capacidad, cerrados con tapa de rosca que garantizó hermeticidad. Las muestras fueron incubadas durante 2 horas a 25°C, pasado ese tiempo se extrajo una alícuota de 1mL de la atmósfera interna de cada frasco con una jeringa Gas Tight Hamilton. Las alícuotas se inyectaron en un cromatógrafo de gases Clarus 500 Perkin Elmer con una columna: DB-1, 60 m, 0,32 mm D.I., 1,0  $\mu\text{m}$  fase estacionaria. El resto de las las condiciones de la corrida fueron: Gas portador:  $\text{N}_2$  8.0 psi (16  $\text{cm}^{-1}\text{s}$ ) Horno: 35 °C (3,0 min), 4 °C/min 50 °C, 45 °C/min, 200 °C (1,0 min). Detector: FID 250 °C Inyector: PSS 100 °C). Para ello se utilizó una curva estándar de etileno. Todo según la técnica descrita por Min X-J y Bartholomew (1993).

### Resultados y Discusión.

Bajo condiciones inductivas desfavorables del verano y con doble aplicación del inductor (figura 1 a), la putrescina mostró dos momentos de máxima acumulación, a las 12 y 48 horas, respuesta dada inmediatamente después de aplicado el Ethrel. Estos resultados sugieren que la producción de etileno endógeno por parte del Ethrel 480 favoreció la acumulación de los niveles de putrescina por presentar ambas rutas un precursor común.

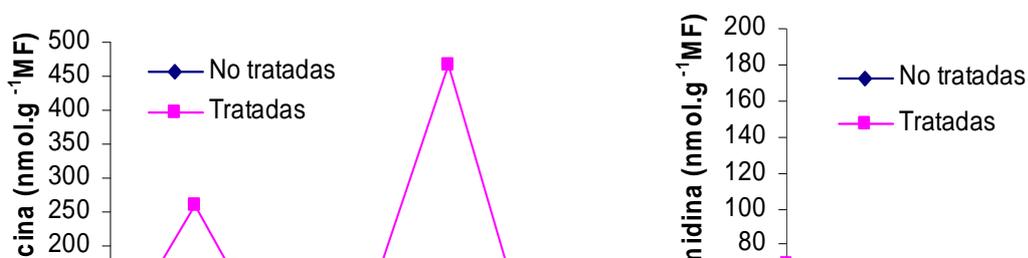


Figura 1 Comportamiento en los niveles de poliaminas (Put, Epd) en plantas tratadas y no tratadas con Ethrel 480 en el proceso de inducción floral bajo condiciones inductivas desfavorables del verano. Las medias de las variantes ensayadas difieren significativamente (\*) o no (ns) en cada de una de las horas evaluadas según prueba t de student para  $p < 0,05$ .

En este sentido la relación existente entre las poliaminas y el etileno ha sido estudiada por diversos autores (Lee y Chu 1992; Lutts y Bouharmont 1996; Turano *et al.*, 1997; Tamai *et al.*, 1999; Locke *et al.*, 2000; Cassol y Matto, 2003) con algunos criterios contradictorios al considerar que la producción de etileno no va acompañada paralelamente de un decrecimiento en los niveles de putrescina en plantas de melón con ACC oxidasa antisentido. En plantas transgénicas (Martínez-Madrid *et al.*, 2002; Metha *et al.*, 2002) observaron que las dos vías metabólicas pueden operar simultáneamente en plantas *in vivo*, lo que sugiere en este caso que los niveles de s-adenosil-1-metionina (SAM) no llegan a ser un factor limitante.

Estas diferencias pueden estar dadas de acuerdo a la especie, al estado de desarrollo de las plantas y al procedimiento experimental (González *et al.*, 2004).

Resulta interesante señalar el comportamiento de la putrescina en plantas no tratadas bajo condiciones inductivas no favorables del verano, al mostrar tendencias similares a las plantas tratadas, aunque con valores inferiores. Esto indica que la interpretación de la relación producción/ emisión de etileno y las poliaminas por los tejidos vegetales se torna compleja en la medida que las plantas están influenciadas por los diferentes factores ambientales en todo su desarrollo. Existe alta influencia y en algunos casos dependencia de ambas rutas metabólicas provocada por las condiciones ambientales predominantes en cada etapa del desarrollo del cultivo (Kende, 1993; Serodio, 2003),

El metabolismo de las poliaminas y en especial la putrescina, puede ser controlado por la luz, y las temperaturas. Esta termorregulación son el ámbito de la enzima arginina descarboxilasa (ADC), y así la S- adenosil metionina (SAM) pudiera estar posiblemente limitada en su disponibilidad por la acción de la enzima (Cruz *et al.*, 1998; Tiburcio *et al.*, 1990).

En condiciones inductivas desfavorables del verano y con doble aplicación los niveles de espermidina en plantas tratadas son inferiores a las plantas no tratadas (figura 1b), mientras que la espermina no fue detectada en plantas tratadas y su concentración fue muy baja en las no tratadas. Este resultado es interesante pues se sabe que al inhibir la síntesis de espermidina se estimuló la floración en mango y se favoreció con ello la biosíntesis de etileno (Protacio., 1998).

Al considerar que el Ethrel 480 libera etileno endógeno y que la presencia de altas concentraciones de éste al principio del cultivo de células de la zanahoria en medio fresco y libre de auxina redujo la formación de poliaminas, y que al contrario, la inhibición de la biosíntesis del etileno causó un aumento en la incorporación de la metionina en espermidina y espermina. (Roustan *et al.*, 1994) se explica el comportamiento detectado en piña.

De las tres poliaminas evaluadas la espermidina se detectó en muy bajas concentraciones lo que está en correspondencia con su contenido en las plantas superiores según lo plantado por (Flores, 1990)

En la figura 2, se observa una razón superior de Put/Spd + Spm en plantas tratadas con respecto a las no tratadas. Esta razón se hace superior en dos momentos debido a la doble aplicación del inductor.

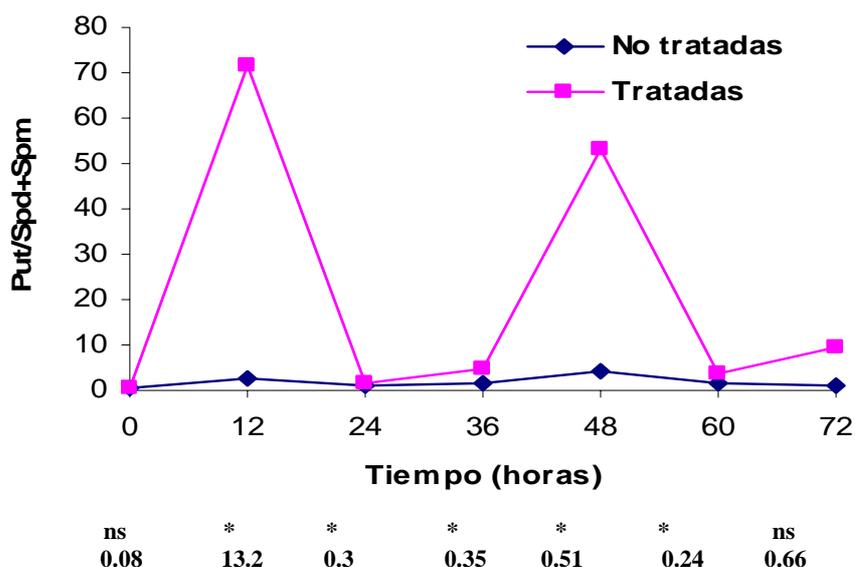


Figura 2. Razón Put/Spd, Epm) en plantas tratadas y no tratadas con Ethrel 480 en el proceso de inducción floral bajo condiciones inductivas desfavorables en verano. Las medias de las variantes ensayadas difieren significativamente (\*) o no (ns) en cada de una de las horas evaluadas según prueba t de student para  $p < 0,05$

Bacharach, (1993) propuso que una alta razón Put/Spd + Spm indican que las células están en activa división. El primer cambio morfológico notable 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 Weaver, (1980).

En otras especies como la caña de azúcar, Castillo (2000) evidenció el papel de las poliaminas en la embriogénesis somática, principalmente la relación Put/Spd + Spm. Se reconoce además que esta relación puede modular los procesos morfogenéticos en interacción con otras hormonas del crecimiento de las plantas. Li y Burrit (2003) encontraron una baja razón Put/Spd en líneas isogénicas de *Dactylis glomerata* L.

Revilla *et al.*, (1996, 1998) en *Olea europaea* demostraron que a medida que aumentaba la edad fisiológica de los explantos, tiene lugar un descenso en los niveles de las poliaminas totales y que la relación Put/Spd+Spm es superior en materiales juveniles que en materiales adultos.

En plantas de piña cv Cayena lisa, la razón Put/Spd+Spm marcó efectos de la aplicación de Ethrel 480 como inductor de la floración. Los máximos valores de esta relación estuvieron asociados a los momentos de aplicación del florigeno. La reiterada vinculación de las poliaminas con los niveles endógenos de etileno, requiere de comprobación en este estudio.

### Determinación de la producción de etileno.

La liberación de etileno endógeno en condiciones inductivas del verano después de realizado el tratamiento de inducción floral con Ethrel 480 se muestra en la figura 3. Es evidente la existencia de dos máximos a las 24 horas y 60 horas en plantas tratadas, aspecto este que coincide con el comportamiento de la putrescina en iguales condiciones de inducción.

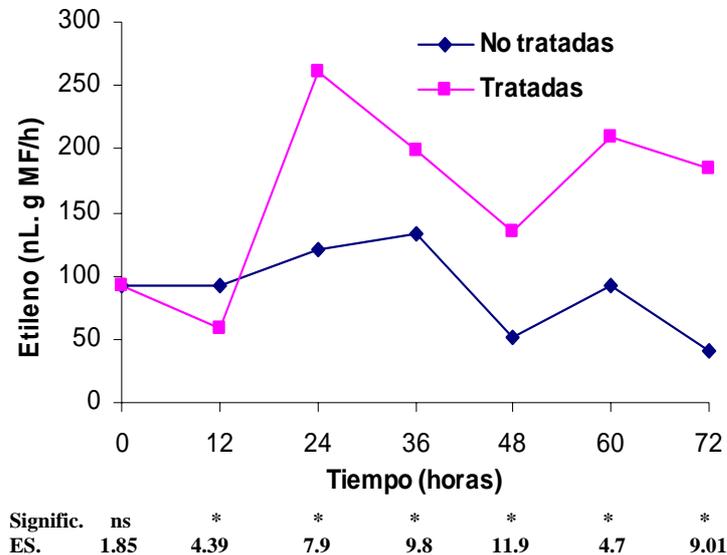


Figura 3 Comportamiento de la liberación de etileno en plantas tratadas y no tratadas con Ethrel 480 en el proceso de inducción floral bajo condiciones inductivas desfavorables del verano. Las medias de las variantes ensayadas difieren significativamente (\*) o no (ns) en cada de una de las horas evaluadas según prueba t de student para  $p < 0,05$ .

En este sentido es razonable pensar que las plantas tratadas con Ethrel 480 incrementaran la producción de etileno cuando se favorece su síntesis y se inhiben los niveles de espermidina y espermina con una acumulación de putrescina. En estas plantas se debió estimular la floración, ya que un nivel particular de etileno o razón de producción del mismo y de las poliaminas pueden regular la floración como parte de un ensamblaje de metabolitos regulatorios (Galston y Kaur-Sawhaey., 1990).

Se ha propuesto que la síntesis de etileno en plantas requiere de contactos con las membranas celulares funcionales: por lo que bajas o altas temperaturas por tiempos prolongados pudieran causar daños temporales en las mismas y con ello inhibición de la síntesis de etileno (Sanewski, 1998).

En plantas de piña cultivar Cayena lisa con estrés hídrico, la producción de etileno y la oxidasa del ACC en tejidos de hojas y tallos resultó ser menor que la observada en plantas testigo y ninguno de los dos tratamientos promovió la floración natural (Minx y Bartholomew., 2005).

### Referencias.

BACHARACH U. (1993). Funtion of naturally occuing polyamines. Academic.New York.

CASSOL T, MATTOO AK. 2003. Do polyamines and ethylene interact to regulate plant growth, development and senescence?. In Molecular insights in plant bioloy (Eds P Nath, A Mattoo, SR Ranade and JH Weil) pp 121-132. (Science Publissner Inc.:Enfield, CT).

CASTILLO R. 2000. Embriogenesis somática en caña de azúcar (*Sacharum spp*).Tesis presentada en la opción a doctor en Ciencias Agrícolas.

CRUZ A, PÉREZ FI, CARO M, ACOSTA M. 1998. Polyamines as shirt-term sal tolérense traits in tomato. Plant sience 138 : 9-16.

- FLORES HE, GALSTON AW. 1982. Analysis of polyamines in higher plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 69: 701- 706.
- Flores, H. E.; Arteca, R. N.; Shannon, Y. J J. 1990. "Polyamines and ethylene. Biochemistry, physiology and interaction. *Amer. Soc. of plant physiologists*: 1-425.
- GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R. 1990. "Polyamines and reproductive activity. 9: 3-8.
- GARCIDUEÑAS MR, MAGDALENA ROBALO. 1985. *Fisiología Vegetal Aplicada*. Tercera edición.
- GONZALEZ A, ARIGITA L, TAMES RS. 2004. Ethylene biosynthesis and endogenous polyamines in relation to development of in vitro cultured kiwifruit explants *PLANT BIOLOGY*, 2004, Vol 31, Iss 6, pp 603-609
- KENDE H. 1993. Ethylene Biosynthesis.- *Plant. Physiol.* 44: 283-307. Garcidueñas M. R. and Magdalena Rovalo. (1985) *Fisiología Vegetal Aplicada*. Tercera Edición.
- LEE TM, CHU C. 1992. Ethylene-induced polyamine accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Plant Physiology* 100,238-245.
- LOCKE JM, BRYCE JH, MORRIS PC. 2000. Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Journal of experimental Botany* 51,1843-1849.E
- Li, Z.; Burrit, D. J. 2003. Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. With different regenerative capacities *Plant Growth regulation*.40 (1) 65-74.
- LUTTS KINET JM, BOUHARMONT J. 1996. Ethylene production by leaves of rice (*oryza sativa* L) in relation to salinity tolerance an exogenous putrescine application. *Plant Science* 116,15-25
- MARTÍNEZ-MADRID MC, FLORES F, ROMOJARO F. 2002. Behaviour of abscisic acid and polyamines in antisense ACC oxidase melon (*cucumis melo*) during ripening. *Functional Plant Biology* 29,865-872.
- METHA RA, CASOL T, LIN ALI, HANDA AK, MATTOO AK. 2002. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature biotechnology*. 20, 613-618.doi:10.1038/NBT0602-613
- MIN XJ, DUANE P, BARTHOLOMEW. 1993. Effects of growth regulators on ethylene production and floral initiation of pineapple.*Acta Horticulturae* 334:101-112.
- MIN XJ, DUANE P, BARTHOLOMEW. 2005. Effects of flooding and drought on ethylene metabolism, titratable acidity and fruiting of pineapple *Acta Horticulturae* 666.
- PROTACIO CM. 1998. Are polyamines involved in the potassium nitrate-induced flowering in mango? *ISHS Acta Horticulturae* 455: V International Mango Symposium.
- ROUSTAN JA, LATCHÉ J, FALLOT. 1994. Role of ethylene on induction and expression of carrot somatic embryogenesis: relationship with polyamine metabolism, *Plant Sci.* 103 223–229.
- SANEWSKI WG. 1998. Preliminary studies into the effects of temperature on flower initiation of smooth cayenne in south east Queensland. En: abstracts, third international Pineapple Symposium. Pattaya,Thailand:Horticultural Research Institute, Bangkok, pp.57
- SERODIO I, MATOS C. 2003. Papel regulador de la luz en la biosíntesis de etileno en plántulas de *Lupinus albus* L. *Biología orgánica: portal de Biología y Ciencias de la Salud*. 11:1-20.

TAMAI T, INOUE M, SUGIMOTO T, SUEYOSHI K, SIRAIISHI N, OJI Y 1999. ethylene-induced putrescine accumulation modulates K<sup>+</sup> partitioning between roots and shoots in barley seedlings. *Physiologia Plantarum* 106, 296-301.

TIBURCIO AF, GENDY AC, TRAN THANH VAN K. 1990. Morphogenes is in tabaco subepidermal call, putrescine as marker of root differentiation. *Plant cell, tissue and organ culture* 19:43-54.

TURANO FJ, KRAMEER GF, WANG CY. 1997. The effect of methionine, ethylene and polyamine catabolic intermediates on polyamine accumulation in detached soybean leaves. *Physiologia Plantarum* 101, 510-518.

WEAVER, R. J. 1980. "Reguladores del crecimiento en la agricultura. E. D. Trillas. México.

Revilla, M. A., Pacheco, J., Berros, B., Rodríguez, R. 1998. Cambios en Pas relacionados con la revascularización in Vitro de material adulto de *Olea europaea L.* VI Simposio-Metabolismo y modo de acción de fitohormonas, Oviedo. S.E.F.V, 213-217.

Revilla, M. A., Pacheco, J., Caares, A., Rodríguez, R. 1996. In Vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea L.*) through micrografting. *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant.* 32,257-261.