

## ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE HOJAS DE ANANA (*ANANAS COMOSUS* L. Merr.) EN DIFERENTES ESTADIOS FENOLOGICOS BAJO DOS SISTEMAS DE CULTIVO

Melanie D. GÓMEZ HERRERA<sup>(1)</sup>; María V. AVANZA<sup>(2)</sup>, y Paula ALAYÓN LUACES<sup>(3)</sup>

**RESUMEN:** El principal factor limitante para el cultivo de ananá (*Ananas comosus* L. Merr.) en el subtropical es la baja temperatura ambiente y su factibilidad está en estrecha relación al desarrollo de tecnología productiva que contemple este factor limitante. El objetivo del presente trabajo fue determinar si las hojas de plantas de ananá que crecen en distintas condiciones ambientales y de cultivo en Corrientes, presentan diferencias en el metabolismo fotosintético. Los momentos de muestreo fueron en: estado vegetativo, inducción floral, plena floración, 30, 60, 90, 120 y 150 DDPF (días después de plena floración). Se muestrearon por vez la hoja "D", en tres momentos del día y se midió ácido málico, pH y clorofila. En las estaciones frías, la actividad fotosintética, influida por las concentraciones de clorofila y ácidos orgánicos tales como el ácido málico, fue más elevada en invernadero que a campo, sin embargo las condiciones del ambiente de cultivo en épocas de mayor temperatura, afectó negativamente a las plantas en el invernadero.

**Abstract:** The main limiting factor for pineapple crops in the subtropics is the low temperature and its production is closely related to the development of production technology. The aim of this work was to determine if the leaves of pineapple plants growing in different environmental conditions and cultivation in Corrientes show differences in photosynthetic metabolism. Sampling times were in: vegetative state, flower induction, full bloom, 30, 60, 90, 120 and 150 DAFB (days after full bloom). The "D" plant leaf was sampled at three times for day and malic acid, pH and chlorophyll was measured. In the cold season, photosynthetic activity, influenced by the concentrations of chlorophyll and organic acids such as malic acid was higher in greenhouse that in the field, however the conditions of growing environment in times with high temperatures, negatively affected plants in the greenhouse.

**Palabras claves:** piña, invernadero, ácido málico, clorofila

**Key words:** pineapple, greenhouse, malic acid, chlorophyll

### INTRODUCCIÓN

El ananá (*Ananas comosus* L. Merr.) es cultivada en más de 60 países tropicales y subtropicales, en donde su fruta es altamente demandada y el cultivo tiene una gran importancia económica. Se ubica en tercer lugar en la producción mundial de frutas tropicales después de la banana y los cítricos y desde el punto de vista económico es la especie más importante de la familia de las Bromeliáceas (Botella y Smith, 2008).

- 
- (1) Alumna de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Trabajo final de graduación modalidad tesina. E-mail: melaniegomezherrera@gmail.com
  - (2) Docente Química Orgánica I, Laboratorio de Tecnología Química UNNE-CONICET, Av. Libertad 5470 (3400) Corrientes, Argentina. E-mail: vavanza@yahoo.es
  - (3) Docente Fruticultura Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Sargento Cabral 2131 (3400) Corrientes, Argentina. E-mail: palayonluaces@yahoo.com

Para satisfacer los requerimientos del mercado interno de fruta de ananá en la Argentina, en el 2011 fue necesaria la importación de fruta proveniente principalmente de Ecuador, Paraguay, Bolivia y Brasil la cual representó un 79% de dicho mercado (Galliano *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta las estadísticas, existe una parte de la demanda interna que podría ser satisfecha por la producción nacional.

La producción comercial de ananá se efectúa con gran eficiencia en los países de climas tropicales y subtropicales, ya que este cultivo no presenta buena tolerancia a las heladas (Py, 1969), siendo éste el principal motivo por el cual su cultivo no se ha extendido en la provincia de Corrientes, ni ha sido estudiado en esta provincia.

La factibilidad del cultivo de ananá en Corrientes está en estrecha relación al desarrollo de un paquete tecnológico que contemple los factores limitantes como lo son las bajas temperaturas. Una posibilidad concreta es el cultivo bajo coberturas plásticas (invernaderos), las cuales modifican el ambiente de cultivo y consecuentemente afectan el crecimiento, desarrollo y características morfológicas de las plantas. Sin embargo las condiciones climáticas que suceden bajo cobertura se alteran por la presencia misma del plástico y estas modificaciones se traducen en un comportamiento diferencial del cultivo en condiciones de plantación bajo cobertura y a campo.

Durante el desarrollo vegetativo de los ensayos instalados ya se ha detectado una serie de manifestaciones diferenciales respecto al crecimiento (Gonzalez Leguizamon *et al.*, 2013) y en las características exomorfológicas de las hojas "D" (Ebel *et al.*, 2016) entre ambos sistemas de cultivo. De estas evaluaciones surge una serie de hipótesis respecto a si estas diferencias morfo-anatómicas también se verían reflejadas en la tasa fotosintética.

Es ampliamente difundido el efecto que tiene el ambiente en las características morfológicas de las plantas e inclusive que genera modificaciones fisiológicas, situación que también se presenta en las bromeliáceas (Martin, 1994). Más aún, las plantas de ananá presentan alta plasticidad morfológica y fisiológica, (Aragón *et al.*, 2012), lo cual incide directamente en el crecimiento, desarrollo y productividad de la plantas. Debido a que el ananá es una planta con metabolismo fotosintético CAM (Ritchie y Bunthawin, 2010), el CO<sub>2</sub> absorbido durante la noche, es metabolizado vía carboxilación de fosfoenolpiruvato a oxalacetato, el cual es entonces reducido a malato (Bartholomew y Malézieux, 1994). Este compuesto es almacenado como ácido málico en la vacuola (Rainha *et al.*, 2016).

La acumulación de ácido málico equivalente a la cantidad de CO<sub>2</sub> fijado durante la noche ha sido reconocida desde hace tiempo como una acidificación nocturna de la hoja (Sale y Neales, 1980).

Hay antecedentes de que las plantas de ananá que crecen bajo condiciones de invernadero presentan plasticidad fenotípica (Ebel *et al.*, 2016) pero se desconoce si dicha plasticidad incide sobre el metabolismo fotosintético.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las hojas de plantas de ananá que crecen en distintas condiciones ambientales y de cultivo en Corrientes, presentan diferencias en el metabolismo fotosintético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), ubicado sobre la Ruta Nacional 12, km 1031 (Latitud Sur: 27°28'27", Longitud Oeste: 58° 47'00"; Altura sobre el nivel del mar 70 msnm) Provincia de Corrientes, Argentina.

El material vegetal con el que se llevaron a cabo los ensayos fueron plantas de ananá (*Ananas comosus* L. Merr.) del cv. Cayena Lisa.

Se realizaron dos lotes experimentales, uno bajo condiciones de campo y otro bajo cobertura plástica (invernadero) ambas con riego. Las parcelas constaron de dos camas de siembra (distancia de centro a centro de 1,20 por 2,10 m de largo), con cuatro hileras de ananá por cama implantadas a tresbolillo, espaciadas a 0,30 m, considerando a las dos hileras centrales como parcelas útiles.

El diseño experimental fue completo al azar con dos tratamientos y tres repeticiones por muestreo, siendo la unidad experimental la planta.

Los momentos de muestreo fueron ocho: estado vegetativo, inducción floral, plena floración, 30, 60, 90, 120 y 150 DDPF (días después de plena floración), para analizar el efecto de las condiciones ambientales y cambios en los distintos estadios fenológicos. Se muestreó la hoja entera adulta totalmente desplegada más larga de la planta (hoja "D"), en tres momentos del día perteneciente a la misma planta y se midió:

\* Acido málico y pH: La fluctuación diurna de pH y de ácidos orgánicos (ácido málico), característica del metabolismo CAM, se establece como la diferencia entre los niveles de estos, determinados entre el comienzo y final del fotoperiodo diario. Por lo tanto, se recolectaron muestras del material vegetal, al comienzo, medio y al final del fotoperiodo diario.

Al momento de la recolección cada muestra fue congelada en hielo seco (-78°C) y almacenada en freezer a -15°C, hasta el momento de su utilización.

Para determinar ambos parámetros se realizó una extracción del contenido celular utilizando 3 gramos de hoja, triturando la muestra de material vegetal en 20 ml de agua destilada.

Se centrifugaron los 20 ml en 2 tubos de vidrio reforzados a 3.000 rpm, durante 10 min a T° ambiente.

Se recogieron los sobrenadantes en vasos de precipitado adecuados y se llevó a volumen con agua destilada hasta 30 ml. Primero se determinó el pH de la muestra y a continuación se procedió a la neutralización de la solución con NaOH 0,05 N.

La valoración del contenido de ácidos orgánicos se expresó en  $\mu$ equivalentes por g PF<sup>-1</sup> (peso fresco) de hoja (Kluge y Ting, 1978; Jimenez *et al.*, 1983).

$$\mu \text{ eq x g PF}^{-1} = \left\{ \frac{0.05 \text{ eq.} \times \text{ml añadidos}}{1000} \right\} \times 10^6 / n^{\circ} \text{ gpf}$$

\* Contenido de clorofila: Se utilizó el método de Arnon (Arnon, 1949). La extracción se realizó a partir de 2 g de hojas (plantas suculentas) en un mortero con arena (una punta de espátula) y 15 ml de acetona al 80% v/v. Se tomaron 4 ml de la muestra proce-

sada y se la centrifugó (1 ml por tubo) a 12.000 rpm durante dos minutos. Los sobrenadantes se mezclaron en una cubeta de espectrofotómetro de 3 ml en el momento de la medición y se determinó la absorbancia de la muestra a 652 nm.

## Análisis de resultados

Con los datos obtenidos se realizaron las comparaciones de las variables medidas, previa comprobación del supuesto de normalidad de los datos y homogeneidad de la varianza. Se realizaron análisis de la varianza y test de Duncan con el software INFOS-TAT (Di Rienzo, *et al.*, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento del metabolismo fotosintético CAM de hojas "D" de ananá se muestra en la Fig. 1. Como es de esperar el contenido de ácido málico disminuyó durante el día y por el contrario el pH ascendió, por lo que la variación de éste acompañó a la del málico. Este proceso se explica debido a la metabolización diurna del ácido málico, el cual fue acumulado en las vacuolas durante la noche y descarbolixado durante el día liberando CO<sub>2</sub> que pasa al ciclo de fotosíntesis tipo C3 o Calvin-Benson.

La variación de este ácido orgánico se modificó a lo largo del ciclo de cultivo. Durante los estadios fenológicos vegetativo, inducción floral (mayo) y plena floración (septiembre) (Fig. 1 A, B y C) el contenido de ácido málico al amanecer presentó diferencias significativas en el invernadero respecto al campo, con un 25% a 33% más en el sistema de cultivo forzado. Esta diferencia sólo se detectó nuevamente en el momento de inducción a floración al mediodía y atardecer (Fig. 1 B) ya que en el estado vegetativo y floración para estos momentos del día no se encontraron diferencias significativas en este parámetro evaluado. La inducción floral consiste en la aplicación de etileno para lograr la diferenciación de meristema vegetativo a reproductivo (Fahl *et al.*, 1981; Reinhartd *et al.*, 1982; Cunha, 1989). Se observó que en este momento las plantas presentaron un comportamiento diferente en relación al ácido málico. Las concentraciones al amanecer fueron las más bajas detectadas en todo el ciclo y pudo haberse debido a la aplicación del inductor, ya que se han registrado alteraciones en ciertos ácidos orgánicos inmediatamente después de la inducción floral mientras la yema apical se está diferenciando (Ahmed y Bora, 1987). La inducción floral se realizó a fines de otoño y los resultados encontrados coinciden con Rainha *et al.*, (2016), quienes citan que cuando la inducción floral en ananá se realiza en otoño-invierno el contenido de ácido málico es más bajo que si se realizara en primavera.

A partir del inicio del crecimiento del fruto, a los 30 días después de plena floración (Fig. 1D), se produjo un aumento de la concentración de ácido málico en el tratamiento a campo, superando al del invernáculo, obteniendo diferencias significativas en los meses de noviembre, diciembre y enero (Fig. 1 E, F y G). Esto puede deberse a que, en los primeros estadios (Fig. 1 A, B y C), en el tratamiento a campo, las temperaturas no eran óptimas para el crecimiento y desarrollo de la planta de ananá. Una vez que inició el

crecimiento de fruto, las temperaturas fueron más benignas viéndose reflejadas en el aumento de la concentración de málico. También este aumento puede explicarse debido a que en el tratamiento a campo se recibió mayor calidad de luz que en el invernadero, el cual influye en la disminución de ácido málico más que la temperatura (Sideris *et al.*, 1947).

Este comportamiento se invirtió con predominancia de ácido málico en invernadero sobre campo, en el octavo muestreo al final del crecimiento del fruto, luego de 150 días desde la plena floración. Probablemente este aumento del ácido málico en el invernáculo se debe a la producción de hijuelos por parte de la planta, reanudando su estado vegetativo al final del crecimiento del fruto.

El comportamiento del pH fue el esperado, ya que aumentó a medida que disminuyó la concentración de ácido málico en el medio. Se cita al ácido málico como el principal ácido orgánico que sufre variación durante la fotosíntesis, sin embargo otros ácidos como citrato y succinato también juegan un rol en este metabolismo CAM. (Kenyon *et al.*, 1985.). Estos ácidos explicarían las diferencias significativas encontradas en pH al final del día cuando no se encontraron diferencias significativas en la concentración de málico.

Las menores concentraciones de ácido málico en ambos tratamientos se dieron en la etapa de inducción floral en mayo; y las mayores concentraciones en los meses de octubre y noviembre durante el crecimiento inicial del fruto. Esto concuerda con estudios realizados en ananá, donde las mínimas concentraciones y acumulaciones de ácido málico se dan cuando la inducción floral se realiza durante el otoño (Rainha *et al.*, 2016). De esta manera, a medida que creció el fruto la planta incrementó su requerimiento de ácido málico para realizar la fotosíntesis.

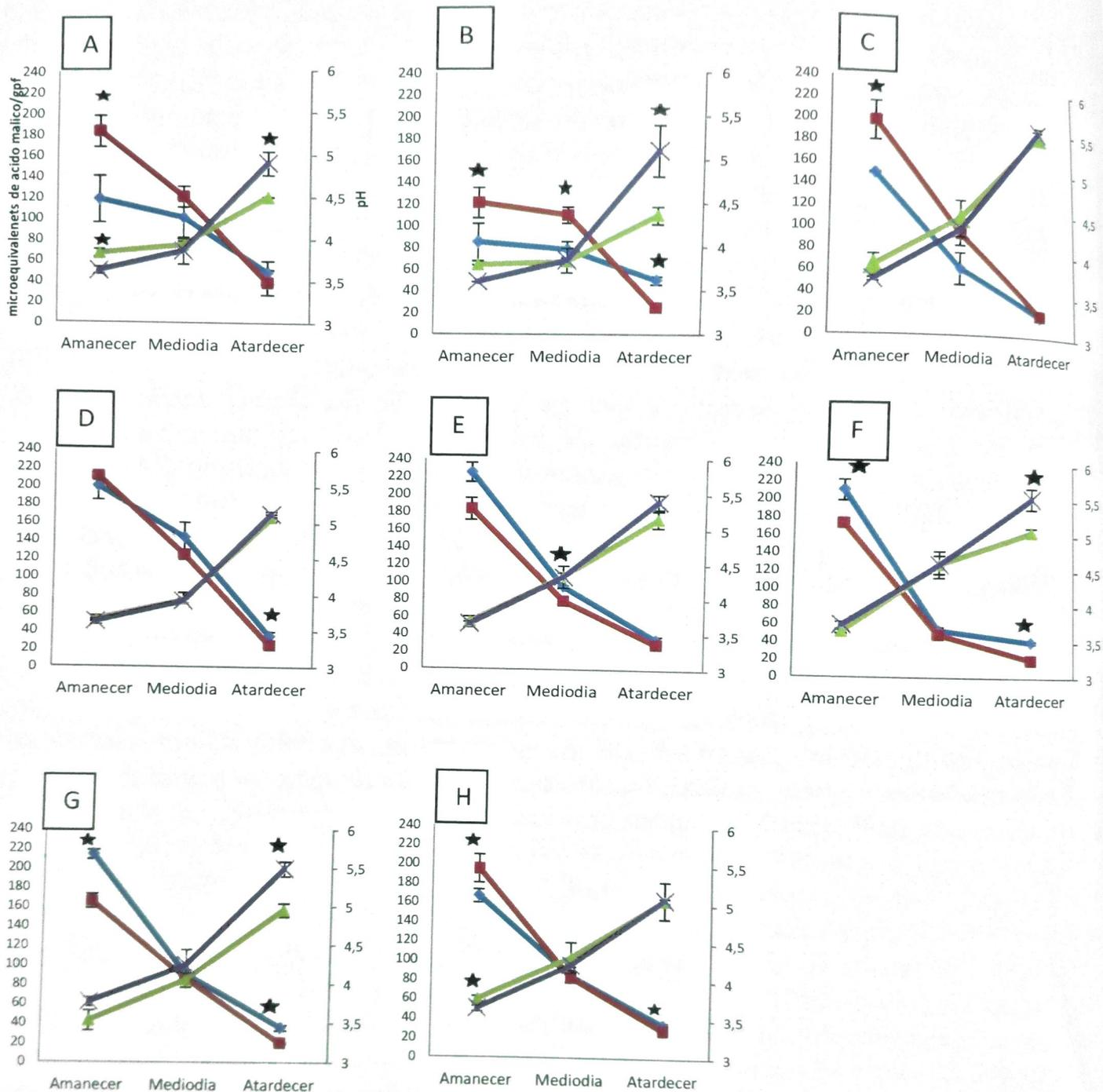


Fig. 1: Variación en el contenido de ácido málico y pH en hojas "D" de ananá en tres momentos del día implantadas en dos sistemas de cultivo (campo e invernadero) durante el ciclo productivo. A: Estado vegetativo, B: Inducción floral, C: Plena Floración, D: 30 DDPF, E: 60 DDPF, F: 90 DDPF, G: 120 DDPF, H: 150 DDPF. (■) ácido málico en invernadero (◆) ácido málico en campo (x) pH en invernadero (▲) pH en campo. \* indica diferencias significativas según Duncan (p ≤ 0,05)

La Fig. 2 muestra la variación porcentual de ácido málico en los distintos estadios fenológicos. En el estadio vegetativo e inducción floral hay una marcada diferencia en cuanto al ritmo de consumo de ácido málico, predominando en las condiciones de invernáculo sobre las de campo, esto se debe a las condiciones ideales de temperatura y humedad que se dan dentro del invernáculo durante las estaciones frías.

El consumo de ácido málico en estadios avanzados, sobre todo en floración, representó el 75-80% de la máxima concentración hallada al amanecer, lo cual coincide con lo citado por Rainha *et al.*, (2016).

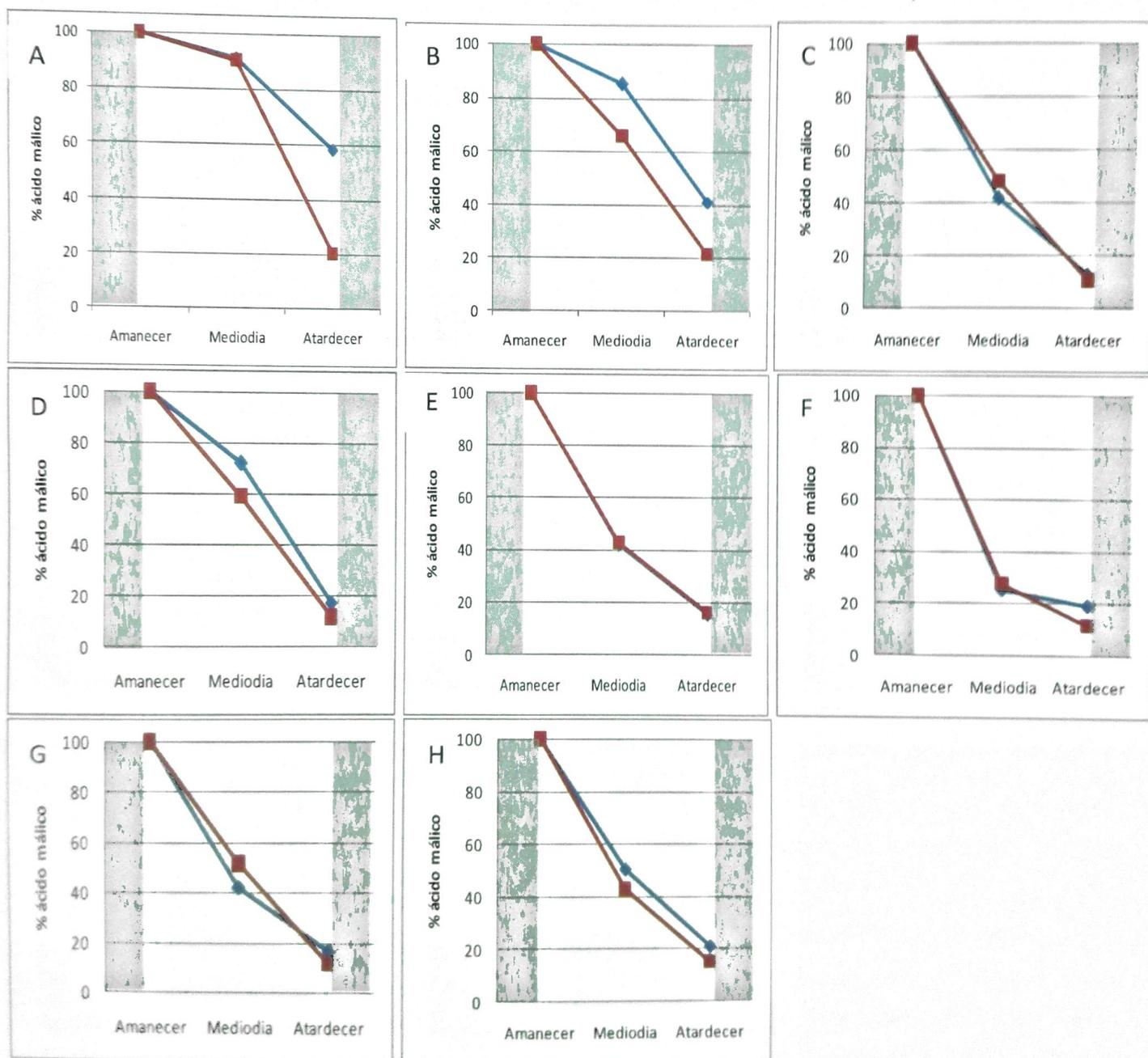
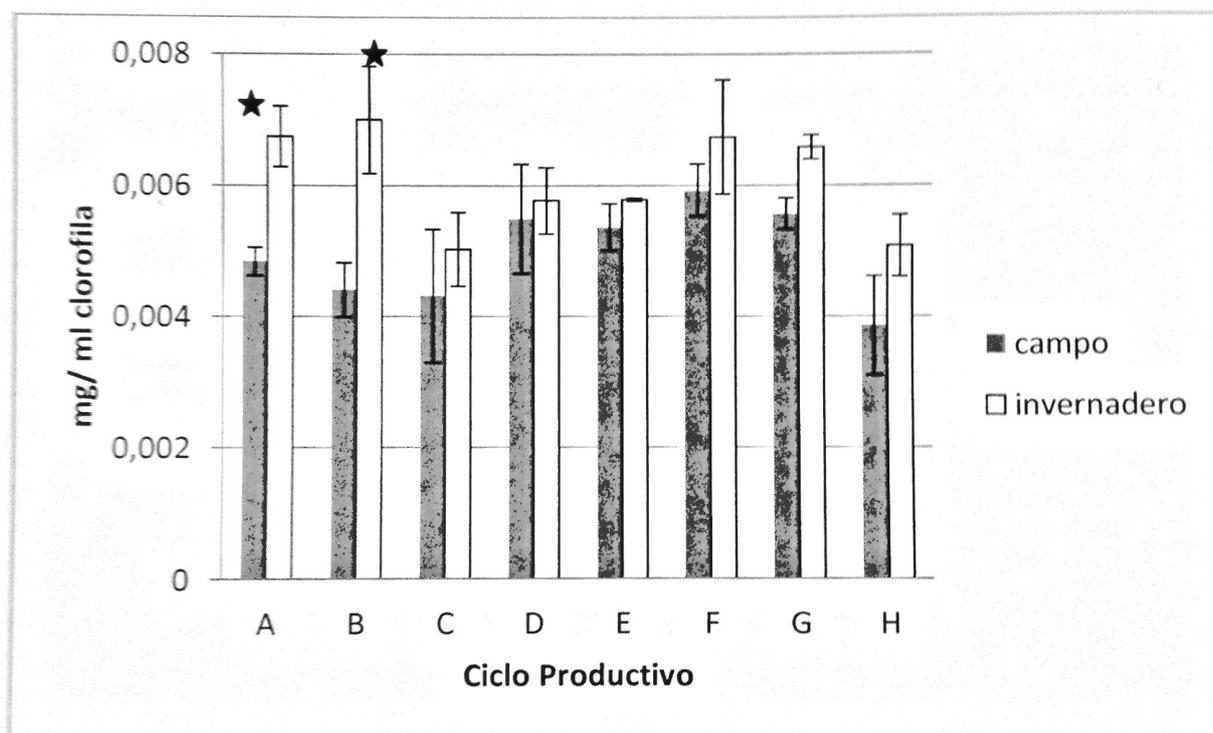


Fig. 2: Consumo porcentual de ácido málico en hojas "D" de ananá en tres momentos del día implantadas en dos sistemas de cultivo (campo e invernadero) durante el ciclo productivo. A: Estado vegetativo, B: Inducción floral, C: Floración, D: 30 DDPF, E: 60 DDPF, F: 90 DDPF, G: 120 DDPF, H: 150 DDPF. (■) ácido málico en invernadero (◆) ácido málico en campo.

En la Fig. 3 se puede observar la variación de contenido de clorofila en ambos tratamientos durante los distintos estadios fenológicos. En las plantas cultivadas en el invernadero el contenido de clorofila presentó su máximo en el mes de mayo (Figs. 3 A y B), luego disminuyó durante el invierno debido probablemente a la menor intensidad de luz durante esta estación. A medida que avanzó el ciclo reproductivo fue aumentando la concentración de clorofila bajo cobertura hasta enero para luego decrecer a fin de ciclo. En cambio las plantas cultivadas a campo mantuvieron contenidos similares durante todo el ciclo. Este comportamiento variable en la concentración de clorofila en las plantas de ananá durante su crecimiento es el esperado para esta especie coincidiendo con la bibliografía consultada (Ebel, 2016).



**Fig. 3:** Contenido de clorofila en hojas "D" de ananá implantadas en dos sistemas de cultivo durante el desarrollo productivo. A: Estado vegetativo, B:Inducción floral, C: Floración, D: 30 DDPF, E: 60 DDPF, F: 90 DDPF, G: 120 DDPF, H: 150 DDPF. \* indica diferencias significativas según Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

## CONCLUSIONES

Se concluye que durante las estaciones frescas (antes y después de la inducción floral y floración) la actividad fotosintética, influida por las concentraciones de clorofila y ácidos orgánicos tales como el ácido málico, fue más elevada en invernadero que a campo. Sin embargo las condiciones del ambiente de cultivo en épocas de mayor temperatura (crecimiento de fruto) afectaron negativamente a las plantas cultivadas bajo invernadero en cuanto a concentración absoluta de ácido málico pero no así respecto al consumo porcentual del mismo, ya que durante el crecimiento del fruto los consumos porcentuales de ácido málico fueron similares en ambos tratamientos.

## BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, F. y P.C. BORA, 1987. Physico chemical changes during flower bud differentiation in pineapple *Ananas comosus* L. Merr. *Indian Journal of Plant Physiology*, 30 (2): 189-193.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemist), 1990. Official Analytical Chemist. 13 ed. Washington, D.C., USA. 1023 p.
- ARAGON, C.; L. CARVALHO; J. GONZALEZ; M. ESCALONA y S. AMANCIO, 2012. The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by environmental conditions. *Plant cell Reports*, 31: 757-769.
- ARNON, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Betavulgaris*. *Plant Physiology*, 24 (1): 1-12.
- BARTHOLOMEW, D.P. y E. MALEZIEUX, 1994. Pineapple, Pp. 243-291. In: *Handbook on Environmental Physiology of Fruits Crops, Vol. II, Subtropical and Tropical Crops*. Schafer, B., and Anderson, P.C (eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- BLACK, C. y B. OSMOND, 2003. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: working the night shift' Minireview. *Photosynthesis Research*, 76: 329-341.
- BOTELLA, J.R. y M. SMITH, 2008. Genomics of pineapple, crowning the king of tropical fruits. Pp. 441-445. In: Moore PH, Ming R (Eds.): *Plant genetics/genomics: genomics of tropical crop plants*. Springer, USA.
- CUNHA, G.A.P., 1989. Eficiência do ethephon, em mistura com hidróxido de cálcio e uréia, na floração do abacaxi. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, 1 (1), 51-54.
- FAHL, J.I.; M.L.C. CARELLI y J.F. FRANCO, 1981. Influência de ethephon com e sem uréia no florescimento de plantas de abacaxi (*Ananas comosus*, L., Merrill) 'Cayenne'. *Planta Daninha. Campinas*, 4 (2), 83-86.
- JIMENEZ, M.S.; D. MORALES; J. IRIARTE y F. GIL, 1983. Succulence and CAM relationships in *Aeonium* genus. *Photosynthesis Research*, 4 : 9-20.
- KENYON, W.H.; R.F. SEVERSON y C. Jr. BLACK, 1985. Maintenance Carbon Cycle in Crassulacean Acid Metabolism Plant Leaves: Source and Compartmentation of Carbon for Nocturnal Malate Synthesis. *Plant Physiology*, 77: 183-189.
- KLUGE, M. e I.P. TING, 1978. Crassulacean Acid Metabolism. Analysis of an Ecological Adaptation. *Ecological Studies. Analysis and Synthesis* (W.D. Billings; F. Golley; O.L. Lage y J.S. Olson Hrsg.) Springer-Verlange. Berlin. 210 p.
- DEL VALLE TASCÓN, S., M.J. SANZ; A. CALATAYUD y E. BARRENO, 1994. Coeficientes de extinción de clorofilas y feofitinas (a y b) en DMSO y ecuaciones para el cálculo de sus concentraciones Abstract IX Congreso Nacional de Botánica Criptogámica. Univ. of Salamanca Septiembre.
- DI RIENZO, J.A.; F. CASANOVES; M.G. BALZARINI; L. GONZALEZ; M. TABLADA y C.W. ROBLEDO, InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> .Ultimo acceso: 29 de Febrero del 2016.
- GALLIANO, M.C.; A. BERAJA; A. ZICIS y J.F. DA COSTA RIOS, 2012. Oportunidades comerciales para las frutas tropicales en la Argentina. En "XXXV Congreso Nacional Hortícola de ASAHO". Corrientes, Argentina: CFI. 115 p.
- EBEL, A.I.; L.I. GIMENEZ; A.M. GONZALEZ y P. ALAYON LUACES, 2016. Evaluación morfoanatómica de hojas "D" de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) en respuesta a la implantación de dos sistemas de cultivo en Corrientes, Argentina. *Acta Agronómica*, 65 (4) (en prensa).

- GONZALEZ LEGUIZAMON, R.; M. CHABBAL; J.F. DOMINGUEZ; S. MAZZA y P. ALAYON LUACES, 2013. Ciclo vegetativo de plantas de ananá (*Ananas comosus* L., Merr.) bajo dos sistemas de cultivo en Corrientes. *Revista Facena*, Vol.29: 11-22.
- MARTIN, C.E., 1994. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. *Botanical Review*, 6 (1): 1-82.
- SIDERIS, C.P.; H.Y. YOUNG y H.H.Q. CHUN, 1947. Diurnal changes and growth rates as associated with ascorbic acid, titratable acidity, carbohydrate and nitrogenous fractions in the leaves of *Ananas comosus* (L.) Merr. *Plant Physiology*, 23(1): 38-69.
- RITCHIE, R.J. y S. BUNTHAWIN, 2010. Photosynthesis in Pineapple (*Ananas comosus* [L.]Merr) Measured Using PAM (Pulse Amplitude Modulation) Fluorometry. *Tropical Plant Biology* (4):193-203.
- RAINHA, N.; V.P. MEDEIROS; C. FERREIRA; A. RAPOSO; J.P. LEITE; C. CRUZ; C.A. PACHECO; D. PONTE y A.B. SILVA, 2016. Leaf malate and succinate accumulation are out of phase throughout the development of the CAM plant *Ananas comosus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100: 47-51.
- REINHARDT, D.H.R.C. y G.A.P. CUNHA, 1982. Indução floral do abacaxi cv. Pérola em função da época da última adubação. *Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas*, 4, 7-14.
- PY, C., 1969. *La piña tropical. Técnicas agrícolas y producciones tropicales*. Editorial Blume. Primera edición. 278 p.
- SALE, P.J.M. y T.F. NEALES, 1980. Carbon dioxide assimilation by pineapple plants, *Ananas comosus* (L.) Merr. I: Effects of daily irradiance. *Aust. J. Plant Physiology*, 7: 363-373.

Recibido/Received/: 04-Abr-2016  
Aceptado/Accepted/: 30-Nov-2016