

DINÁMICA DE LA CLOROFILA EN REGIONES DEL LIMBO PARA HOJAS DE DIFERENTES NIVELES FOLIARES EN TABACO NEGRO

Alejandro Izquierdo Medina¹, Amaury Borges Miranda²

¹ Estación Experimental del Tabaco. Finca Vivero, San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba.

² Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera Tumbadero km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Seis mediciones SPAD por hoja se necesitan para diagnosticar la madurez técnica en el tabaco negro, por lo que encontrar las regiones del limbo más informativas al respecto significaría mayor precisión y ahorro de tiempo. Los objetivos del trabajo es definir dónde ocurre el mayor ritmo de variación de la clorofila, su sentido y la región de mayor concentración con el paso del tiempo. El experimento se realizó mediante un diseño completamente aleatorizado en el año 2001, en la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez. Se estudiaron dos factores: la región (ápice, centro y base) y el momento (emisión del botón y a los 3, 6 y 9 días posteriores) en que se tomó la muestra. Se efectuaron 8 mediciones para cada región y momento en 4 hojas (h-2; h-10; h-15; h-22), numeradas desde la base hasta el ápice caulinar. Para la h-22, la mayor concentración se trasladó de la base al ápice y aumentó en todas las zonas. La h-15 siempre tuvo más concentración en el ápice, donde disminuyó sus niveles progresivamente hasta no diferenciarse con el centro. Hubo disminución en todas las zonas para h-10 y h-2, y la mayor concentración se trasladó del ápice al centro en la primera y siempre estuvo en el centro en la segunda. El mayor ritmo de cambio para h-22; h-15 y h-10, se detectó en el ápice y para la h-2, la clorofila disminuyó más velozmente en el centro del limbo foliar.

Palabras claves: Tabaco, clorofila, SPAD, hoja, madurez

ABSTRACT

CHLOROPHYLL DYNAMIC IN BLADE REGIONS OF LEAVES FOR DIFFERENT FOLIATE LEVELS IN BLACK TOBACCO

Six SPAD measurements per leaf are needed for diagnosing ripeness in black tobacco; therefore, finding more informative blade regions means higher precision and saving of time. The aims of this work were: to define in a dynamic way, the area where a higher rhythm of variation of chlorophyll takes place, its sense and the region where the pigment is more concentrated. The experiment was executed in a completely randomized design during the year 2001 at the Experimental Tobacco Station in San Juan y Martínez. Two factors were studied: the region (apex, center and base of the leaf blade) and the moment (bud emission; 3; 6 and 9 days after bud emission), in which SPAD readings were taken. Eight readings were performed for each moment in all regions of the leaf lamina in 4 leaves numbered from the base to the shoot apex (h-2; h-10; h-15; h-22). The highest chlorophyll concentration moved from the base to the apex and increases in all foliate regions were noticed

for h-22. The pigment was always more concentrated in the apex, where its levels progressively diminished until not differing with the center for h-15. Withdrawal was observed in all zones for h-10 and h-2, the highest concentration moved from the apex to the center in the first one, while for the second one the center had always the maximum level. The highest rhythm of change for h-22; h-15 and h-10, were detected in the apex and for h-2, chlorophyll diminished more quickly in the center of the leaf blade.

Key words: Tobacco, chlorophyll, SPAD, leaf, ripeness

INTRODUCCIÓN

El término madurez técnica de la hoja de tabaco Negro, tiene una definición puramente práctica, pues se refiere al momento en que la hoja está en las mejores condiciones para enfrentar el proceso de curación. El contenido promedio de clorofila foliar es un marcador fisiológico que permite definir la madurez con una simple medición a través del SPAD – 502 (MINOLTA, Spectrum Technologies Inc.). Se promedian seis lecturas a cada hoja. Los valores disminuyen ligeramente al llegar a ese instante. (Borges *et al.*, 2007).

Para reducir el número de mediciones que se deben realizar por hoja, se requiere eliminar las lecturas en las regiones del limbo foliar donde el pigmento varía menos. Por eso, se necesita conocer la dinámica de los niveles del metabolito en tres regiones. El momento de emisión del botón floral ofrece una oportunidad para estudiar hojas en diferentes estadios de desarrollo y un punto de partida para el estudio dinámico.

Los movimientos de metabolitos hacia adentro o afuera de la hoja se realizan por el floema, para lo que se requiere de la maduración estructural y funcional de los vasos conductores o venas. A través del floema de transporte o clase I y II (vena central y las ramas que se bifurcan de esta respectivamente) y de liberación o venas clase III (que forman islas entre las venas clase II adyacentes) ocurre la descarga del floema en los sumideros jóvenes (Wright *et al.*, 2003), mientras que, la carga del floema en una hoja

fuente madura ocurre por medio del floema colector o venas clase IV y V, que están inmaduras en los sumideros y no son funcionales durante la t s-f. (Imlau *et al.*, 1999; Oparka *et al.*, 1999).

Durante el período de vida de los órganos vegetales, la entrada y salida de N ocurren simultáneamente, pero a partir del momento en que las hojas comienzan a comportarse como fuentes, predomina la salida de N y clorofila, que se hace máxima al iniciarse la senescencia. Por esa razón, dicho pigmento es un marcador de la transición sumidero – fuente, de la madurez técnica y de la senescencia foliar (Guiamet, 2004; Portau *et al.*, 2006).

Los objetivos del presente trabajo fueron: definir, la zona donde hay un mayor ritmo de variación de la clorofila, su sentido y la región donde se concentra más el pigmento con el paso del tiempo, para hojas con diferentes estadios de desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y localización del experimento

El experimento se realizó en condiciones de campo durante el verano de 2001 en una parcela situada en áreas de producción de semilla de la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, en un suelo Ferralítico Amarillento Lixiviado (Hernández *et al.*, 1999). La variedad utilizada fue la «Criollo 98» cultivada al sol.

Factores en estudio, descripción de los tratamientos y análisis estadísticos

El experimento se efectuó siguiendo las condiciones de un diseño completamente aleatorizado. Se seleccionaron 10 plantas al azar que no fueron desbotonadas a las cuales se les tomaron lecturas con el SPAD – 502 en el momento de la emisión del botón floral y a los 3; 6 y 9 días posteriores (DPB). Los factores en estudio fueron: la región en la que se efectuó la medición (ápice, centro y base del limbo foliar) y el momento en que se tomó la misma. Se presentaron los datos según la posición que ocupan las hojas en el tallo (hojas 2; 10; 15 y 22), numeradas desde la base hasta el ápice caulinar. Se realizaron 8 mediciones en cada región de la hoja para cada momento de medición.

Se comprobó la normalidad de los datos experimentales mediante la prueba de Kolmogorov – Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene. Se realizaron ANOVAs de clasificación simple donde se evaluaron los efectos de cada uno de los factores en estudio. Las diferencias entre las medias se establecieron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Todas las inferencias estadísticas se realizaron para una confiabilidad del 95 %. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 12 (SPSS Inc.)

Las labores fitotécnicas efectuadas fueron las reportadas en el Instructivo Técnico para la producción de semilla. (MINAG, 2004).

RESULTADOS

Para la h-22 (figura 1), en las tres regiones del limbo foliar donde se realizaron las mediciones hubo incrementos de los valores SPAD con el paso del tiempo. Si bien la base tuvo los mayores niveles en el momento de emisión del botón, desde los 3 DPB hasta los 9 DPB, el ápice superó al centro y este a su vez a la base (tabla 1).

En la h-15 (figura 1) se apreció un ligero aumento de la clorofila con el tiempo en la base y el centro de la hoja, mientras en el ápice, disminuyó a partir de los 3 DPB. En los tres primeros momentos (tabla 1), se detectaron mayores valores SPAD en el ápice que

en el centro y en este último, mayores que en la base. Los contenidos del ápice y centro no se diferenciaron a los 9 DPB y fueron superiores a los de la base.

Para la h-10 (figura 1) en las tres regiones estudiadas disminuyeron los valores SPAD con el tiempo. En el momento de emisión del botón (tabla 1), el mayor contenido del pigmento se detectó en el ápice, sin diferencias con el centro, mientras en los últimos tres momentos, los niveles del metabolito se concentraron más en la región central.

Los valores SPAD disminuyeron con el transcurso del tiempo en las tres regiones del limbo foliar analizadas en la h-2, (figura 1) y el ápice tuvo el menor contenido de clorofila en todos los momentos en los que se realizó la medición (tabla 1).

En el momento de emisión del botón floral, las hojas centrales de la planta muestran la mayor concentración de clorofila si se promedian los contenidos de las tres regiones. Además, en la h-10 y h-15, la menor dispersión en los datos ocurrió cuando se detectaron las mayores concentraciones de clorofila (tabla 2). Coincidentemente, en ambas hojas, el mayor contenido promedio del metabolito se obtuvo cuando los valores SPAD del ápice y el centro no mostraron diferencias: a los 9 DPB para la h-15 y en emisión del botón floral para la h-10 (tabla 1).

DISCUSIÓN

En las hojas jóvenes aumentó dinámicamente el contenido de clorofila. Se observaron mayores valores SPAD en el

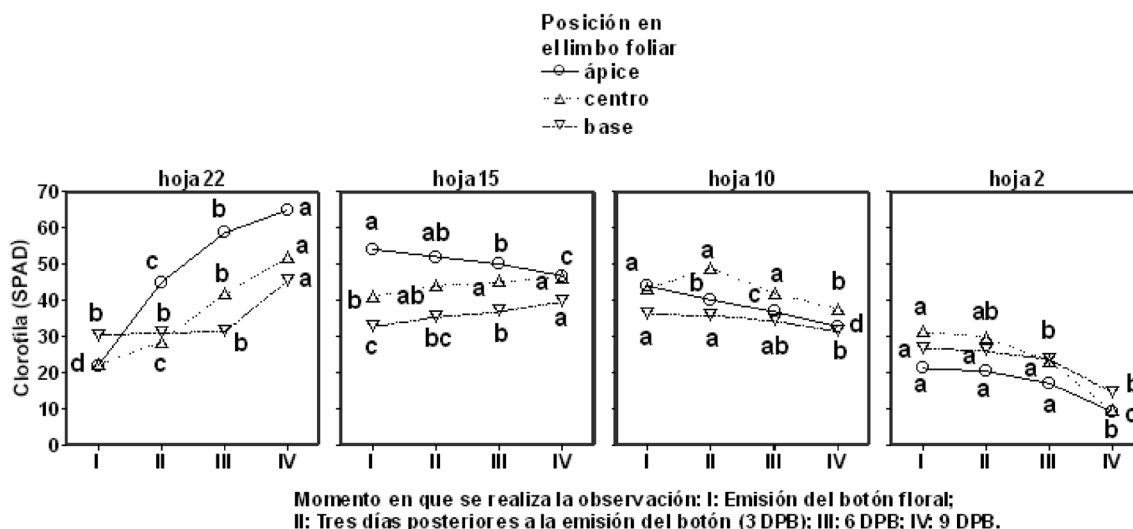


Figura 1:

Dinámica de la clorofila en regiones del limbo para hojas situadas a diferentes alturas en el tallo, numeradas desde la base hasta el ápice caular.

Se analiza, para cada zona, las diferencias en cuanto a la concentración de clorofila entre los diferentes momentos de medición. Se muestran las medias de 8 mediciones en cada región y momento. Letras diferentes significan medias distintas según test de rangos múltiples de Duncan para un 5 % de significación. Coeficientes de variación (CV). Errores estándar (ESx).

h-22:

ápice: CV = 3,23 %; ESx = 0,8907. centro: CV = 6,53 %; ESx = 1,3667. base: CV = 3,19 %; ESx = 0,6334.

h-15:

ápice: CV = 2,40 %; ESx = 1,2081. centro: CV = 2,69 %; ESx = 0,6929. base: CV = 0,96 %; ESx = 0,1998.

h-10:

ápice: CV = 4,47 %; ESx = 1,0789. centro: CV = 1,16 %; ESx = 0,1345. base: CV = 5,51 %; ESx = 1,0902.

h-2:

ápice: CV = 18,58 %; ESx = 2,2359. centro: CV = 17,20 %; ESx = 2,2572. base: CV = 12,59 %; ESx = 1,2300.

ápice y hubo aumentos al transcurrir el tiempo. Para la h-22 y la h-15, el ápice presentó el mayor ritmo de cambio de la clorofila, con un aumento de 4,6 SPAD por día para la primera y una disminución de 0,82 SPAD por día para la segunda.

La región que tuvo mayor concentración de clorofila de las hojas más viejas fue el centro del limbo foliar, donde disminuyó su concentración. Para la h-10, siguió siendo el ápice la región donde el ritmo de cambio fue superior, con una reducción de 1,2 SPAD por día, mientras en la h-2, el centro tuvo el cambio más acelerado de los niveles del pigmento, con un descenso de 2,4 SPAD por día.

Existen varios reportes de la literatura que relacionan la transición sumidero – fuente (t s-f), con la distribución de la clorofila y el desarrollo estructural y funcional de varias clases de vasos conductores foliares

(Wright *et al.*, *op. cit.*), lo que apoya los resultados presentados.

Se conoce que, antes de que la hoja llegue a la expansión completa, ocurre progresivamente una transición de estado importador neto (sumidero), a exportador neto (fuente) en dirección acropetal (Turgeon, 1984), por lo que las hojas comienzan a movilizar fotoasimilados y compuestos nitrogenados hacia afuera, comenzando por el ápice.

Según los resultados analizados, los sumideros jóvenes, experimentaron un aumento de la clorofila en dirección basipetal, lo que pudo deberse a la descarga de fotoasimilados y compuestos nitrogenados desde las venas de clase III, que comienzan a hacerse funcionales en esa misma dirección. A medida que avanza el tiempo, la descarga de solutos desde las venas de clase III, disminuye, hasta su cese total. Las venas menores (clase IV y V), maduran estructural

Tabla 1: Medias de los valores SPAD en diferentes regiones del limbo foliar para cuatro momentos y cuatro posiciones en el tallo. Se analiza, para cada instante y posición en el tallo, si existen diferencias entre las regiones del limbo foliar. Letras diferentes significan medias diferentes según test de rangos múltiples de Duncan para un nivel de significación del 5 %.

Hoja / Número	Región del limbo foliar	Momento en que se realizó la observación			
		Emisión del botón	3 DPB	6 DPB	9 DPB
h-22	Base	30.3 a	30.9 b	31.3 c	45.3 c
	Centro	22.1 b	28.4 b	41.7 b	51.8 b
	Ápice	21.8 b	45.0 a	58.7 a	65.0 a
	CV (%)	7.09	5.25	4.52	0.81
	ESx	1.0101	1.0411	1.1536	0.2564
h-15	Base	32.8 c	35.1 c	36.7 c	39.7 b
	Centro	41.2 b	43.9 b	45.1 b	46.2 a
	Ápice	54.1 a	51.9 a	49.9 a	46.7 a
	CV (%)	4.54	2.24	2.52	1.24
	ESx	1.3106	0.5605	0.6390	1.3401
h-10	Base	36.0 b	36.1 c	34.3 b	31.1 b
	Centro	43.1 a	43.9 a	41.8 a	37.6 a
	Ápice	43.9 a	40.1 b	36.9 b	32.7 b
	CV (%)	2.98	2.59	4.31	4.94
	ESx	0.7128	0.6001	0.9318	1.3116
h-2	Base	26.7 b	26.3 b	23.5 a	14.4 a
	Centro	31.2 a	29.7 a	23.1 a	9.5 a
	Ápice	21.1 c	20.4 b	17.1 b	9.1 a
	CV (%)	6.95	12.89	11.38	29.56
	ESx	1.0705	1.9091	1.4118	1.8433

Tabla 2: Media de los valores SPAD de clorofila entre todas las regiones del limbo foliar para las h-10 y h-15. Se analizan las diferencias entre los momentos en que se realizó la medición. Letras diferentes significan medias diferentes según test de Rangos Múltiples de Duncan para una significación del 5 %. EBF: Emisión del botón floral.

Momento en que se realiza la observación	h-10			h-15		
	Clorofila SPAD	Desv. Típica	Coef. de variación	Clorofila SPAD	Desv. Típica	Coef. de variación
EBF	39.9 a	3.82	9.57	42.1	11.9	27.74
3 DPB	37.9 ab	4.1	10.81	42.9	9.8	23.28
6 DPB	36.2 b	6.09	16.82	44.1	7.8	17.69
9 DPB	31.9 c	7.03	22.03	44.0	4.2	9.54
ESx	0.9465			0.3981		
CV (%)	1.03			0.97		

y funcionalmente una vez que ocurre la t-s-f y comienzan a colectar los compuestos que son exportados de las fuentes en dirección acropetal. (Imlau *et al.*, *op. cit.*; Oparka *et al.*, *op. cit.*; Wright *et al.*, *op. cit.*).

El contenido de N y clorofila de una hoja llegan al máximo en su expansión completa y posteriormente declinan linealmente con el tiempo (Hikosaka, 2005). Es de suponer que, en las h-10 y h-15, situadas más al centro de la planta, estén ocurriendo pérdidas iniciales del pigmento en el ápice al momento de la emisión del botón floral. Un análisis del contenido promedio de clorofila de estas hojas permitió observar que, la mayor concentración coincidió con el momento en que no hubo diferencias entre los valores SPAD del ápice y el centro del limbo foliar (tablas 1 y 2). En este instante dichas hojas tuvieron un color más uniforme, a pesar de la ligera disminución del pigmento en el ápice. Dicha evidencia es apoyada por la idea de que el metabolito disminuye en dirección acropetal (Turgeon, *op. cit.*).

Cuando las hojas de tabaco Negro llegan a su madurez técnica, la clorofila se reduce en aproximadamente un 8 % de la máxima concentración alcanzada (Ares, 2002). Las condiciones en las que se desarrolló este experimento (plantas sin desbotonar y no curado de las hojas), no permiten ofrecer resultados conclusivos en cuanto a la relación entre la distribución de la clorofila y el término madurez técnica, pero se pudiera plantear la hipótesis de que, el momento en que se igualan los valores SPAD del ápice y centro de la lámina foliar representa un instante cercano al punto de madurez técnica de las hojas. Esta hipótesis necesita confirmación experimental.

CONCLUSIONES

- La mayor concentración de clorofila en la h-22, se trasladó de la base al ápice y hubo aumentos en todas las zonas.

- En la h-15, el pigmento siempre se concentró más en el ápice, única región donde disminuyó sus niveles progresivamente hasta no diferenciarse con el centro.

- Para h-10 y h-2, disminuyó el contenido del metabolito en todas las zonas y la mayor concentración se trasladó del ápice al centro en la primera, mientras para la segunda siempre estuvo en el centro.

- El mayor ritmo de cambio para h-22; h-15 y h-10, se detectó en el ápice y para la h-2, la clorofila disminuyó más velozmente en el centro del limbo foliar.

Recomendaciones

- Utilizar las lecturas SPAD del ápice, centro y base del limbo foliar para diagnosticar la madurez técnica del tabaco Negro.

- Realizar un estudio dinámico de la distribución de la clorofila en condiciones de producción y con curado de las hojas, para comprobar la hipótesis propuesta.

BIBLIOGRAFÍA

Ares, D. M.: «Importancia de la bioquímica en los procesos de curación y fermentación, y usos no convencionales del tabaco». En: El tabaco cubano: de los orígenes a la comercialización (diplomado), 2002.

Borges, A., A. Izquierdo., B. Hernandez. y Y. León.: La clorofila foliar como criterio para recolectar el tabaco negro *Nicotiana tabacum* L. Var. «Corojo 99» cultivada bajo tela. *Cuba Tabaco*. 8 (1), 2007.

Guamet, J.J.: La senescencia foliar: incógnitas del desmantelamiento celular. Instituto de Fisiología Vegetal. *Universidad Nacional de La Plata*. cc 327. 1900. 2004.

Hernández, A. *et al.*: Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. 64pp. Ed. Ministerio

- de la Agricultura. Instituto de Suelos, Ciudad de La Habana, 1999.
- Hikosaka, K.: Leaf Canopy as a Dynamic System: Ecophysiology and Optimality in leaf turnover. *Annals of Botany*. 95: 521 - 533, 2005.
- Imlau, A; B. Truemit and N. Sauer.: Cell - to - cell and long - distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*. 11: 309 - 322, 1999.
- MINAG: *Manual técnico para la producción de semilla de tabaco*. 9 pp. La Habana. Ed. Instituto de Investigaciones del Tabaco. 2004.
- Oparka, K.J.; A.G. Roberts; P. Boevnik *et al.*: Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 14: 1567 - 1577, 1999.
- Pourtau, N., R. Jennings, E. Pelzer *et al.*: Effect of sugar induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*. 224, 558-568. 2006.
- Turgeon, R.: Termination of nutrient import and development of vein loading capacity in albino tobacco leaves. *Plant Physiol*. 76, 4548. 1984.
- Wright, K.M., A.G. Roberts, H.J. Martens, N. Sauer and K. Oparka.: Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to AtSUC2 promoter activity. *Plant Physiology*. 131. 1555 -1565. 2003.