

49810

**JASMONATOS Y GIBERELINAS EN RELACIÓN A LOS
PROCESOS DE ESTOLONIZACIÓN Y TUBERIZACIÓN EN**
Solanum tuberosum L. cv. Spunta



T.111

Lic. Gabriela Isabel Castro



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Guillermina Abdala

**Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Ciencias Naturales**

1999

NO SE PRESTA

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Director de Tesis

Dra. Guillermina Abdala

Doctorando

Lic. Gabriela Isabel Castro

Comisión Asesora y Tribunal de Tesis

Dra. Estela Machado

Dr. Juan A. Argüello

Dr. Horacio A. Tigier

The image shows three handwritten signatures in blue ink, each positioned above a horizontal dotted line. The top signature is the most prominent and appears to be 'Estela Machado'. The middle signature is less distinct but appears to be 'Juan A. Argüello'. The bottom signature is also less distinct but appears to be 'Horacio A. Tigier'. The signatures are written in a cursive style.

01805

T 111

INDICE

Introducción general

Control de la tuberización	2
Ambiente	2
Edad del tubérculo madre	3
Genética	4
Area de la hoja	4
Carbohidratos	5
Reguladores del crecimiento	6
Giberelinas	7
Presencia de giberelinas en plantas	7
Relación estructura-actividad	7
Biosíntesis	8
Metabolismo	10
Efecto en la tuberización	10
Jasmonatos	11
Presencia de jasmonatos en plantas	12
Biosíntesis	12
Metabolismo	13
Efecto en la tuberización	14
Hipótesis	17
Objetivo general	17

CAPÍTULO I

Relaciones hormonales endógenas

Introducción	19
Hipótesis	21
Objetivos	22
Materiales y métodos	22
Material Vegetal	22

Extracción, purificación y cuantificación de jasmonatos	23
Extracción, purificación, identificación y cuantificación de GAs	25
Resultados	31
Discusión	45

CAPÍTULO II

Aplicaciones exógenas

I - Microgota foliar: nueva técnica para la propagación de papa *in vitro*

Introducción	51
Objetivos	53
Materiales y métodos	53
Material vegetal	53
Bioensayo A: JA incorporado al medio de cultivo	53
Bioensayo B: JA aplicado por vía foliar	54
Resultados	54
Discusión	56

II. Efecto del fotoperíodo y fitohormonas sobre la morfogénesis de microplantas de papa *in vitro*

Introducción	58
Objetivos	60
Materiales y métodos	60
Material vegetal	60
Tuberización <i>in vitro</i>	60
Diseño experimental	61
Resultados	61
Ensayos a oscuridad continua	61
Ensayos bajo condiciones de día corto	62
Ensayos bajo condiciones de día largo	62

Análisis estadístico	69
Discusión	71
III. Efecto del factor radical sobre la expresión de la tuberización	
Introducción	76
Objetivos	77
Materiales y métodos	77
Material vegetal	77
Bioensayo	77
Diseño experimental y análisis estadístico	78
Resultados	78
Análisis estadístico	86
Discusión	87
IV. Efecto del ácido jasmónico en la expansión celular	
Introducción	89
Objetivo	90
Materiales y métodos	90
Material vegetal	90
Bioensayo	91
Preparación de yemas para microscopía óptica	91
Medición del área celular	91
Diseño experimental	92
Resultados	92
Discusión	95
Conclusiones	98
Referencias bibliográficas	102

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

ACC: ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico

AIA: ácido indol 3, acético

BA: benciladenina

AcOH: ácido acético

CA: ácido curcúbico

CCC: 2-cloro-etiltrimetil cloruro de amonio

DC: día corto

DL: día largo

EtoAc: acetato de etilo

GAs: giberelinas

GC-MS: cromatografía gaseosa y espectrometría de masa

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

JA: ácido jasmónico

LA: ácido linolénico

MeJA: metil jasmónico

MeOH: metanol

MS: medio Murashige-Skoog

MTs: microtúbulos

OC: oscuridad continua

PDA: ácido fitodienoico

PF: peso fresco

PS: peso seco

TA: ácido tuberónico

TAG: glucósido del ácido tuberónico

SHAM: ácido salicil-hidroxámico

UNZ: uniconazol

RESUMEN

La tuberización es un evento morfogénico complejo regulado por factores externos como el fotoperíodo y la temperatura, y por factores internos como las fitohormonas.

Para abordar el estudio de la estolonización y tuberización en plantas de *Solanum tuberosum* L. cv. Spunta se llevaron a cabo experimentos para conocer las relaciones hormonales endógenas entre giberelinas y jasmonatos a lo largo de las diferentes etapas de la ontogenia de la planta; así como también se analizó el efecto de los mencionados reguladores aplicados exógenamente sobre el proceso de tuberización.

Los resultados indican la existencia de un balance hormonal endógeno que regula el proceso de tuberización. En las etapas tempranas del crecimiento de la planta, las concentraciones endógenas de giberelinas determinadas en raíces impedirían la tuberización. Este hecho fue posteriormente corroborado mediante aplicaciones exógenas de reguladores del crecimiento a estacas uninodales de papa cultivadas *in vitro*, en presencia y ausencia de sistema radical. Las estacas enraizadas tratadas con ácido jasmónico retardaron la tuberización debido al aporte de giberelinas por estos órganos, y uniconazol, inhibidor de la biosíntesis de giberelinas, revirtió este efecto.

Con el avance del crecimiento de la planta los niveles de jasmonatos aumentan modificando el balance interno en las raíces, lo que sugiere que estos órganos serían importantes reguladores en la formación de los tubérculos.

A diferencia de lo que ocurre en raíces, los niveles de ácido jasmónico en follaje disminuyen con la ontogenia. Esta disminución podría estar causada por un transporte basípeto de este compuesto, ya que si el ácido jasmónico no es metabolizado a sus formas solubles y transportado a otras partes de la planta podría desencadenar respuestas de defensa.

En estolones se observaron dos pulsos hormonales de ácido jasmónico, uno de ellos ocurriendo al inicio de la estolonización y que estaría involucrando a este regulador en la orientación de los microtúbulos corticales originando el posterior ensanchamiento de la región subapical; y un segundo pulso de ácido jasmónico que determinaría el agrandamiento celular en el tejido parenquimático.

Como pudo comprobarse en cultivo *in vitro* de yemas de tubérculos de papa, las células del corpus tienen capacidad de expandirse por acción del ácido jasmónico aplicado exógenamente. Por otro lado tratamientos con ácido jasmónico a estacas uninodales de papa condujo a la formación de tubérculos de mayor peso seco bajo condiciones fotoperiódicas de día corto, día largo y oscuridad continua.

Dado que las concentraciones requeridas para inducir tuberización son las mismas que las necesarias para inducir expansión celular se presume que los altos valores endógenos de ácido jasmónico encontrados en estolones al inicio de la tuberización causarían *in situ* expansión celular, y consecuentemente la formación de tubérculos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guillermina Abdala por guiarme en la realización de esta tesis, por brindarme su incondicional apoyo científico y personal, y por la confianza depositada en mi.

Al Dr. Juan Alberto Argüello por otorgarme la posibilidad de realizar las experiencias de aplicaciones exógenas de reguladores en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Córdoba.

Al Dr. Otto Miersch por el aporte de su conocimiento científico durante mi estadía de perfeccionamiento en el Institut für Pflanzenbiochemie (Halle), Alemania.

Al Dr. Ricardo Tizio por su disposición y por el valorable aporte de su experiencia.

A los integrantes de la Comisión Asesora por las sugerencias aportadas en las reuniones y en la posterior corrección del trabajo de Tesis.

A CONICET por el otorgamiento de las becas que permitieron el desarrollo de esta Tesis.

A DAAD por el otorgamiento de la beca para mi estadía en el Institut für Pflanzenbiochemie (Halle), Alemania.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por el marco académico e institucional.

A los integrantes de las Cátedras de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Río Cuarto y de la Universidad Nacional de Córdoba por el compañerismo y el afecto recibido.

A mis compañeros por las horas de laboratorio compartidas.

A mi familia por el apoyo y comprensión.

A Pablo por su constante apoyo y paciencia; por el aporte de los dibujos morfológicos y por toda su comprensión.

a María Teresa y Pablo



INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

La iniciación de la tuberización está acompañada de importantes cambios morfológicos y bioquímicos (Ewing, 1995). El tubérculo es la estructura reproductiva que se origina a partir de los meristemas caulinares, y culmina con el engrosamiento característico que constituye dicho órgano (Trippi, 1982). Un tubérculo de papa es un tallo modificado, con nudos (ojos), entrenudos y sus hojas son diminutas como escamas. El eje del tubérculo es corto y ensanchado, y sus tejidos llenos de almidón; la anatomía del tubérculo se asemeja a la de un tallo (Ewing, 1995).

Las raíces se forman en los nudos inferiores, los que dan origen a los tallos estoloníferos de crecimiento plagiotrópico, que forman los tubérculos (Trippi, 1982). La tuberización comienza en la zona subapical del estolón, y el engrosamiento comienza acrópetamente en los entrenudos que estaban presentes en la etapa de iniciación. Al mismo tiempo que ocurre el engrosamiento, la actividad del meristema en el ápice del estolón cesa. La acumulación de almidón comienza en una etapa muy temprana de la ontogenia del tubérculo (Ewing, 1995). El tubérculo se forma gracias al crecimiento de la peridermis, corteza, cilindro vascular, zona perimedular y médula (Gregory, 1956).

En *Solanum tuberosum* L. los tubérculos se forman sobre los estolones subterráneos, aunque experimentalmente pueden formarse sobre tallos aéreos. En condiciones inusuales pueden formarse tubérculos sobre el suelo, especialmente en las yemas axilares, cualquier yema o ápice de tallo además de los estolones pueden tuberizar bajo las condiciones apropiadas. Por ejemplo, las yemas axilares de estacas desarrollan tubérculos si ellas son colocadas bajo tierra (Ewing, 1995).

Control de la tuberización

Ambiente

El factor ambiental más estudiado es el fotoperíodo. Es sabido que noches

largas favorecen la inducción de la tuberización; con lo que respecta a la formación de tubérculos, las papas son plantas de requerimientos de día corto. Presumiblemente la respuesta a la tuberización este mediada por el fitocromo, ya que 5 minutos de luz roja interrumpiendo el período de oscuridad se redujo la tuberización, y el rojo lejano tiende a revertir el efecto de la luz roja (Ewing, 1995).

La temperatura tiene un pronunciado efecto en los niveles de inducción de la tuberización. Temperaturas frías (noches de menos 20°C) favorecen la tuberización (Ewing, 1995). Los brotes cultivados *in vitro* a una temperatura de 17°C tuberizan antes que a 26°C (Claver, 1967). El efecto de la temperatura y el fotoperíodo depende de la irradiancia bajo la cual la planta está creciendo. Efectos de días largos o altas temperaturas son exagerados a bajos niveles de irradiancia (Ewing, 1995). Existen pocos antecedentes sobre la intensidad de la luz en la regulación de la tuberización; Claver y Montaldi (1976) señalaron que intensidades de 80 $\mu\text{W cm}^2$ determinan la formación de tubérculos, y que altas intensidades (8000 $\mu\text{W cm}^2$) determinan una reversión del fenómeno y reorientación de la morfogénesis del crecimiento vegetativo.

Un cuarto factor ambiental que afecta la tuberización es la disponibilidad de nitrógeno por la planta. Altas concentraciones de fertilizantes nitrogenados aplicadas al suelo reducen la tuberización. En condiciones de hidroponía nitrógeno se produce inmediatamente tuberización en los estolones; adición de nitrógeno nuevamente puede causar la reversión del tubérculo a estolón (Ewing, 1995).

Edad del tubérculo madre

A pesar de que las plantas de papa pueden propagarse mediante semillas, comúnmente suelen crecer de tubérculos. La condición fisiológica de los tubérculos plantados influyen sobre la respuesta de la planta al medio ambiente. Tubérculos plantados inmediatamente superado el período de dormición producen plantas cuya tuberización es más temprana que aquellas que se desarrollaron de tubérculos viejos. Tubérculos que son extremadamente viejos, debido a un almacenamiento prolongado a bajas o cálidas temperaturas no desarrollan brotes normales. Por lo que los tubérculos se forman en los ojos (Ewing, 1995).

La edad de la planta madre tiene una importante acción reguladora, por cuanto la capacidad de las estacas para tuberizar aumenta con la edad de las plantas, con disminución de las exigencias fotoperiódicas y desarrollando la capacidad de tuberizar en oscuridad (Esashi, 1963).

Genética

Hay una gran diferencia genética entre las plantas de papa en respuesta a al ambiente. Variedades adaptadas a condiciones fotoperiódicas de 12 hs y temperaturas frías son clasificadas como *Solanum tuberosum* L. ssp. *andigena*. Cuando crecen a altas temperaturas o en tierras bajas de los trópicos, o días largos de verano en zonas templadas, las papas *Andigenas* tuberizan débilmente. Las papas adaptadas al verano en las zonas templadas (las papas de Chile, Europa y América del Norte) son clasificadas como *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*. Las papas *tuberosum* tienen baja producción en las tierras tropicales debido a que la tuberización es gatillada muy temprano e intensamente por temperaturas bajas y días cortos, en consecuencia hay un desarrollo del tallo muy pequeño como para soportar la buena producción de tubérculos. Además existen diferencias genéticas sustanciales en respuesta al fotoperíodo dentro de cada grupo (Ewing, 1995).

Area de la Hoja

Otro factor en la tuberización es el tamaño de la planta. Cuando las condiciones genéticas y ambientales son favorables para la tuberización, los tubérculos se pueden formar en plantas muy pequeñas (Ewing, 1995). Por ejemplo, plantas de *tuberosum* crecidas de semillas tuberizan sólo cuando se ha desarrollado una hoja por encima de los cotiledones, especialmente si el fotoperíodo es corto. En el otro extremo, plantas *andígenas* pueden crecer por más de seis meses sin tuberizar si se las expone a fotoperíodos largos. Estos no son particularmente estados del desarrollo que coincidan con la tuberización. De todos modos experimentos con estacas con diferentes áreas de hojas demostraron que cuando las condiciones son iguales, estacas con hojas grandes tuberizan más que

aquellas con áreas chicas. Si las condiciones ambientales son favorables para la tuberización puede entonces depender del área de la hoja de la planta (Ewing, 1995).

Carbohidratos

Existen algunas razones para pensar que la acumulación durante el día de fotoasimilados en las hojas juegan un papel en la inducción de la tuberización. La tuberización *in vitro* es muy sensible a la concentración de sacarosa, y esto no es simplemente un efecto osmótico (Gregory, 1956). Ni glucosa, ni fructuosa son tan efectivos como sacarosa en el requerimiento de azúcar. Del mismo modo cualquiera de las dos es superior a la sacarosa en promover crecimiento de tallo *in vitro* (Ewing, 1985). La transferencia a fotoperíodos cortos incrementa la acumulación diurna de almidón en las hojas de papa (Chatterton y Silvius, 1980) y la acumulación de almidón continúa igual luego de que se establece un fuerte descenso hacia el tubérculo que demanda fotoasimilados (Lorenzen y Ewing, 1990). Plantas transgénicas que contienen un gen invertasa de levadura expresado en el apoplasto de hoja mostraron solo una pequeña reducción en el contenido de almidón de las hojas durante la noche, presumiblemente debido a que muy poca sacarosa, la única forma en la que el carbohidrato es transportado al tubérculo (Heineke et al., 1992; Oparka, 1986), estaba disponible para ser exportada vía tubo criboso (Heineke et al., 1992). Todo esto presenta la posibilidad de que cuando las plantas normales son inducidas, aumentan los niveles de sacarosa transportados desde hojas durante la noche a los ápices del estolón y contribuye a la iniciación de la tuberización (Ewing, 1995).

Aunque análisis de sacarosa y azúcares reductores de ápices de estolones de *Solanum demissum* no sustentan esta hipótesis de que la acumulación de sacarosa en el ápice del estolón contribuye al inicio de la tuberización (Vreugdenhil y Helder, 1991), hay problemas en identificar en plantas intactas cuáles son los ápices de estolones que están justo en el límite de tuberización. Bajo fuerte inducción, no todos los ápices están destinados a convertirse en tubérculos, y es imposible predecir cuáles se ensancharán y cuándo ocurrirá. Obviamente, para el

tiempo en el que el ensanchamiento es visible es demasiado tarde para analizar los cambios ocurridos en el primer estadio de la tuberización. Para resolver este problema Vreugdenhil y Helder (1991) midieron contenido de azúcar versus contenido de almidón, tomando el último valor como un indicador del estado de tuberización. El nivel de sacarosa no cambió a medida que el contenido de almidón se fue incrementando en el estolón, y los niveles de glucosa y fructuosa decrecieron. Aparentemente hay una mayor disminución de fructuosa que de glucosa al mismo tiempo que el almidón en el ápice del estolón aumenta un 9 % del peso seco (Vreugdenhil y Helder, 1991).

Genes de la síntesis de patatina e inhibidor de proteinasa II, dos proteínas que parecen estar íntimamente asociadas a la tuberización, son activadas por la exposición del tejido de hoja de papa a altas concentraciones de sacarosa (Park, 1990; Sanches-Serrano et al., 1990). De todos modos, la hipótesis de que la expresión de estas dos proteínas de almacenamiento son inducidas por el aumento de la concentración de sacarosa no está sustentada por la evidencia de plantas transgénicas en donde la síntesis de almidón es inhibida (Ewing, 1995).

En conclusión, la evidencia de la función que juega la acumulación de carbohidratos en inicio de tuberización es aún confusa. Un incremento diurno de almidón en hoja puede ser medido dentro de los dos días después de haber colocado la planta a condiciones inductivas. El almidón es degradado a la noche y exportado como sacarosa, sin embargo el análisis de plantas salvajes no han demostrado una acumulación de sacarosa en el extremo del estolón asociado con la acumulación de almidón en tubérculo (Ewing, 1995).

Reguladores del crecimiento

El proceso de tuberización parece estar regulado por la acción combinada de diferentes fitohormonas (Koda, 1997). Una disminución en los niveles de giberelinas es un prerequisite para la tuberización (Okasawa, 1960; Koda y Okasawa, 1983). Los jasmonatos pueden causar el cese de la elongación del estolón e induce el ensanchamiento de la región subapical del mismo. Las citocininas, que se acumulan en la región ensanchada (Koda, 1982, Koda y

Okasawa, 1983), parecen inducir el crecimiento vigoroso debido a la división celular. Por otro lado ABA, el cual se incrementa continuamente durante la tuberización (Koda y Okasawa, 1983) parece inducir la dormición de los meristemas apicales.

Giberelinas

Las GAs son una familia de compuestos ácidos diterpenos tetracíclicos con un sistema anular ent-giberelano (Fig. 1). Existen dos tipos de GAs, las C₂₀-GAs que tienen 20 átomos de carbono y las C₁₉-GAs en las cuales se pierde el carbono veinte (Sponcel, 1995). Hasta el momento se conocen 116 giberelinas. Por convención las giberelinas endógenas fueron numeradas de GA_{1,2,3...n} siguiendo el orden de su descubrimiento (MacMillan y Takahashi, 1968).

Presencia de giberelinas en plantas

Las giberelinas en un principio fueron aisladas del hongo *Gibberella fujikuroi*, en el que desempeñan un papel de metabolitos secundarios. Actualmente se conoce que se encuentran en diversas especies de hongos, en algunos helechos, en Gimnospermas y Angiospermas (Sponcel, 1995). De las 116 giberelinas conocidas 85 han sido identificadas solo en plantas superiores, 12 sólo están presentes en *Gibberella* y muchas de ellas se encuentran presente en ambos. Como ocurre con *Gibberella* una especie de Angiosperma sola puede poseer muchas giberelinas diferentes (Sponcel, 1995).

Relación estructura/actividad

Existen numerosas variaciones en la estructura de las giberelinas: diferentes estados de oxidación del C-20, presencia de grupos metil (CH₃), hidroximetil (CH₂OH), aldehído (CHO) o ácido carboxílico (COOH). Grupos funcionales pueden adicionarse al esqueleto giberelano, especialmente a C₁₉-GAs. Es frecuente la inserción de grupos hidroxil (OH) dentro del anillo y menos comunes son los sustituyentes epoxi (>O) y cetona (=O). La posición y la estereoquímica de los

grupos funcionales es muy importante. Takahashi et al. (1986) resumen la relación estructura/actividad de las giberelinas como sigue:

1. Las GAs que tienen una estructura C₁₉ tales como GA₃, GA₇, GA₃₀ y GA₃₂ o la pérdida de la doble ligadura entre C-1,2 tal como GA₁ y GA₄ muestran muy alta actividad biológica.
2. Las GAs con un grupo hidroxilo en el C-2, tales como GA₈, GA₂₉, GA₃₄ y GA₄₀ muestran muy poca actividad.
3. Las GAs-C₂₀ muestran baja actividad respecto a las C₁₉; esto se debe a que las primeras son precursores biosintéticos de las C₁₉ y muestran actividad luego de su conversión a GAs-C₁₉.
4. Las giberelinas que poseen grupos carboxílicos en el C-4, C-6 y C-10, tales como GA₁₃, GA₁₇, GA₂₅, GA₂₈ y GA₃₉ muestran una actividad extremadamente baja. Estas giberelinas tricarboxílicas son consideradas productos finales y no son convertidas a GAs-C₁₉, las cuales son muy activas.

Biosíntesis

La biosíntesis de GAs está estructurada en tres etapas individuales (Coolbaug, 1983; Hedden, 1983; Graebe, 1987).

1. desde ácido mevalónico a ácido geranil pirofosfato (GGPP) y ciclización de GGPP a ent-kaureno
2. ent-kaureno a GA₁₂-aldehído
3. vía de GA₁₂-aldehído

En esta última etapa se sintetizan las GAs activas a través de diferentes rutas: la 13 α -hidroxilación temprana, la 13 β -hidroxilación y la no hidroxilativa. La ruta 13 α -hidroxilación temprana es la predominante en la mayoría de las especies vegetales (Talón, 1993) y comienza con la conversión de GA₁₂ a GA₅₃ catalizada por una GA 13 α -hidroxilasa (monooxigenasa P450).



Fig. 1. Estructura de las giberelinas conocidas hasta el momento.

Metabolismo

La ruta metabólica de GAs en papa es la misma que en otras especies investigadas. Siguiendo los productos metabólicos de [^{14}C]GA₁₂ y [^{14}C]GA₁₂-aldehído, ocho giberelinas de la vía temprana de la 13-β-hidroxilación (GA₅₃-aldehído) (Oparka, 1986; Hussey y Stacey, 1984; Ewing y Struik, 1992) fueron detectadas en los ápices de tallos de *Andigena* indicando que esta vía opera en tallos de papa y es probablemente la vía predominante (Van der Berg et al., 1994b). De todas maneras hay evidencias que la vía no hidroxilativa también funciona. GA₅₁ fue detectada (Van der Berg et al., 1994b) y GA₁₅ ha sido informada en frutos de papa (Jones et al., 1988).

No se encontraron diferencias en [^{14}C]GA₁₂ y [^{14}C]GA₁₂-aldehído entre plantas crecidas a 16 hs o 10 hs de luz, lo que sugiere que el fotoperíodo no tiene acción sobre la vía metabólica de GAs. Es posible que el control fotoperiódico exista antes de la formación de GA₁₂-aldehído (Zeevaart y Gage, 1993).

Efecto en la tuberización

Existen en la bibliografía varios intentos para medir cambios en las hormonas endógenas y correlacionarlas con la inducción o no de la tuberización de las plantas de papa. Uno de los primeros cambios informados fue una disminución en la actividad tipo GAs (Okasawa, 1960; Railton y Wareing, 1973). Los ciclos de días cortos produjeron una declinación en la actividad tipo giberelínica en extractos de hojas de *Andigena* crecidas previamente bajo día largo (Railton y Wareing, 1973).

Una baja irradiación, que tiende a inhibir la tuberización, aumenta sustancialmente las sustancias tipo GAs en hojas expuestas a DC, mientras que en DL los niveles de estas sustancias fueron altos a pesar de los niveles de irradiación (Woolley y Wareing, 1972). Similarmente altas temperaturas aumentan la actividad tipo GA de tallos, no obstante, las yemas son más afectadas por las altas temperaturas que las hojas. Si las plantas de papa crecen a altas temperaturas y

las yemas son extraídas o químicamente inhibidas, el efecto retardante de la temperatura en la tuberización disminuye (Menzel, 1981).

No sólo el fotoperíodo largo, alta temperatura y baja irradiación tienen efectos similares en la tuberización, todos producen efectos en la morfología del tallo que son consistentes con los efectos conocidos de las GAs (Ewing y Struik, 1992).

Koda y Okasawa, (1983b); Smith y Rappaport, (1969) señalaron una sustancial disminución de la actividad giberelínica durante la conversión del estolón a tubérculo.

Jasmonatos

El ácido jasmónico (JA) y su metil éster (Me-JA) han sido intensamente estudiados desde su descubrimiento hace aproximadamente treinta años atrás. Las primeras investigaciones se centraron en la función potencial en el crecimiento y desarrollo en plantas. Experimentos realizados por Gregory (1956) y Chapman (1958) proporcionaron evidencias de una sustancia transmisible que inducía tuberización, que era producida en hojas y luego transportada a estolones donde iniciaba tuberización.

Koda et al. (1988) aislaron de las hojas de plantas de papa una sustancia específica que inducía tuberización y Yoshihara et al. (1989) la identificaron como 3-oxo-2-(5'- β -D-glucopiranosiloxy-2-cis-pentyl)ciclopentano-1-ácido acético. La sustancia es un glucósido (Fig. 2 A) y su aglicón fue denominada ácido tuberónico (Fig. 2 B). La estructura química del del ácido tuberónico (TA) está muy relacionada con la del JA (Fig. 2 C).

Metil jasmónico (Me-JA) (Fig. 2 D) fue encontrado como componente aromático de los aceites esenciales de *Jasminium grandiflorum* L. y *Rosemarious officinalis* L. (Demole et al., 1962; Crabalona, 1967) y es actualmente reconocido como uno de los ingredientes más importantes en la industria del perfume. JA fue aislado como un inhibidor del crecimiento del medio donde se cultivaba *Lasiodiplodia theobromae* Griff y Maulb. (sinónimo de *Botryodiplodia theobromae* Pat.) un hongo común tropical (Aldridge et al., 1971). Este fue el primer informe indicando que JA tenía un efecto regulador en plantas. El ácido cucúrbico (CA) (Fig. 2 E), el cual

difiere de JA por poseer un grupo hidroxilo en vez de oxígeno en el C₃, fue aislado de semillas de *Cucurbita pepo* (Fukui et al., 1977a, b).

El ácido jasmónico y compuestos relacionados han sido designados como Jasmonatos, están distribuidos en todo el reino vegetal y juegan importantes roles en la regulación del desarrollo de plantas. Recientemente los jasmonatos han demostrado ser potentes inductores de la expresión génica, como por ejemplo de los genes del inhibidor de proteinasa en plantas de tomate (Farmer and Ryan, 1990), genes de proteínas de almacenamiento en plantas de soja (Anderson, 1988) y genes involucrados en la defensa (Gundlach et al., 1992).

Presencia de jasmonatos en plantas

Los jasmonatos han sido encontrados en una gran variedad de especies vegetales y aparentemente en casi todos los órganos de la planta (Staswick, 1992).

Meyer et al. (1984) investigaron la presencia de JA y Me-JA en diferentes partes de plantas utilizando distintos métodos tales como cromatografía gaseosa (GC), espectrometría de masa (MS), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), radioinmunoensayos y bioensayos. El JA ha sido determinado en tejidos y órganos de especies de Angiospermas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Miersch et al., 1986), en Gimnospermas (Sembdner et al., 1989; 1990), así como también en hongos (Miersch et al., 1987; 1989; 1992; 1993).

Biosíntesis

La secuencia de reacciones que convierte el ácido linolénico (LA) a JA se esquematizan en la Fig. 3. Al comienzo, la enzima lipoxigenasa cataliza la incorporación de O₂ al C₁₃ del ácido linolénico. Luego el ácido 13-hidroperoxilínolénico es transformado a un derivado del óxido de aleno (12,13-EOT) por la acción de la hidroperóxido dehidrasa, así el óxido aleno es convertido a 12-oxo-PDA por la aleno óxido ciclasa. El doble anillo de 12-oxo-PDA es saturado por una reductasa (Vick and Zimmerman, 1987) y la reacción produce OPC-8:). Luego, seis carbonos son removidos del carboxil cambiado por β-oxidación

ocurriendo tres veces sucesivamente, y finalmente se forma el JA.

El ácido tuberónico (TA) puede ser fácilmente formado a partir de JA por hidroxilación del C-5 y por reducción del grupo ceto al C-3 del ciclopentano a grupo hidroxilo respectivamente (Vick and Zimmerman, 1987).

Metabolismo

La transformación de JA aplicado exógenamente a plántulas de cebada, tomate y papa (Meyer et al., 1989; Meyer et al., 1991a; Meyer et al., 1991b), así como también en cultivos de suspensión de células de tomate, papa (Kehlen, 1991) y *Eschscholtzia* (Xia and Zenk, 1992) demostraron que la conjugación es además de otras vías metabólicas, común en tejidos vegetales. De acuerdo a la Fig. 4 los pasos metabólicos más comunes aparte de la conjugación son la hidroxilación del C-11 (usualmente) o C-12 formando los derivados 11-OH o 12-OH (relacionados con TA) y reducción del C-6 del grupo ceto resultando en metabolitos relacionados al ácido cucúrbico. Conjugación por O-glucosilación de los metabolitos hidroxilados da 11-O- o 12-O-glucósidos, o 6-O-glucósidos de estructuras relacionadas al ácido cucúrbico.

La conjugación con aminoácidos de otros jasmonatos es frecuente en plantas. En tallos de cebada se identificaron conjugados con valina, isoleucina y leucina (Meyer et al., 1989; Meyer et al., 1991a; Meyer et al., 1991b). En suspensiones celulares de tomate y papa (Kehlen, 1991) además de la conjugación con aminoácidos ocurre la conjugación con azúcares, determinándose glucosil JA y éster gentiobisil como los mayores metabolitos. En cultivo de células en suspensión de *Eschscholtzia*, JA fue metabolizado a 11-O- β -D-glucósido de 11-(R)-OH-JA (Xia and Zenk, 1992).

El 6-O-glucósido de ácido cucúrbico fue encontrado en semillas de calabazas (Koshimizu et al., 1973) y el 12-O- β -D-glucopiranosido del 12-O-JA, el aglucón del ácido tuberónico ocurren como compuestos nativos en papa y *Helianthus tuberosus* L. (Matsuura et al., 1993). Muchos otros aminoácidos conjugados de JA han sido encontrados: conjugados con tirosina (Tyr), triptófano (Trp) y fenilalanina (Phe) en flores de haba (Brückner et al., 1988; Schmidt et al.,

1990), con isoleucina (Ile) en frutos, y conjugados de Ile, leucina (Leu) y valina (Val) en hojas jóvenes de haba.

Entre los jasmonatos conjugados, los amino-conjugados son los predominantes; están ampliamente distribuidos y sus niveles endógenos aumentan rápidamente en respuesta al estrés. Los conjugados O-glucósidos son un importante grupo que tienen relevancia en la tuberización y por último los metil éster conjugados son compuestos volátiles que exhiben un alto potencial fisiológico y como moléculas señales entre plantas en respuesta a estrés (Sembdner et al., 1994).

Efecto en la tuberización

Un compuesto relacionado al ácido jasmónico (JA) es la propuesta más reciente para un compuesto natural que contraresta el efecto de las GAs y promueve tuberización (Yoshihara et al., 1992). El compuesto activo ha sido identificado como 3-oxo-2 (5'- β -D-glucopiranosiloxi-2'-z-pentenil)-ciclopentano-1-ácido acético (Koda et al., 1988). Su aglucón fue denominado TA. Primeramente se puso énfasis en el glucósido como sustancia inductora; concentraciones por debajo de 3×10^{-8} M agregadas al medio de cultivo estimularon tuberización *in vitro* (Koda et al., 1988). Los mismos autores informaron que JA y su metil éster, TA y TAG todos mostraban similar promoción de la tuberización en los bioensayos utilizados (Koda et al., 1991a). El ácido cucúrbico (CA), y el metil éster de CA son también activos pero requieren de mayor concentración para obtener el mismo porcentaje de tuberización (Koda et al., 1991a).

El fotoperíodo controla las enzimas hidroxilativas, las cuales convierte el JA a compuestos glicosidados, y los hacen transportables de las hojas al estolón donde pueden iniciar tuberización (Helder et al., 1993).

La tuberización es iniciada por la expansión celular de la región subapical del estolón. Takahashi et al. (1994) demostraron que JA y Me-JA inducían expansión celular en células de tubérculos de papa pero TA y TAG no indujeron expansión (datos informados por Koda et. al., 1997 como no publicados).

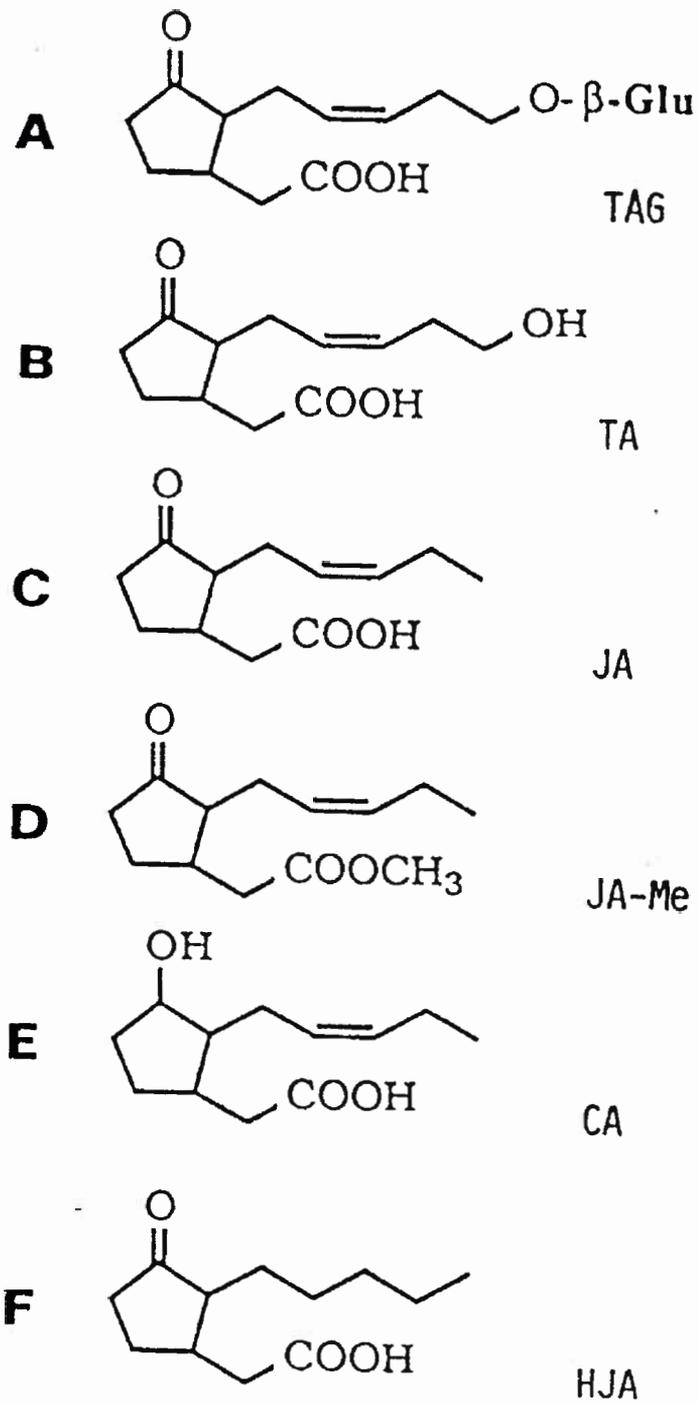


Fig. 2. Estructura química de los jasmonatos presentes en plantas: **A**, ácido glucosil tuberónico; **B**, ácido tuberónico; **C**, ácido jasmónico; **D**, metil-jasmónico; **E**, ácido cucúrbico; **F**, ácido dihidro-jasmónico.

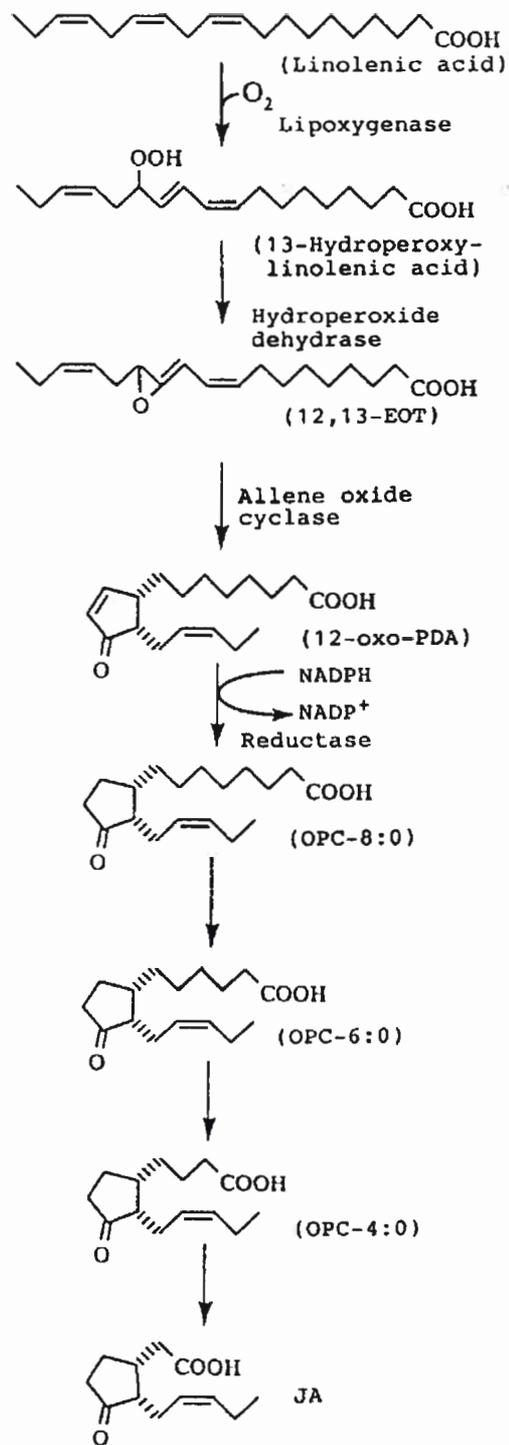


Fig. 3. Ruta biosintética del ácido jasmónico (Vick y Zimmerman, 1984).

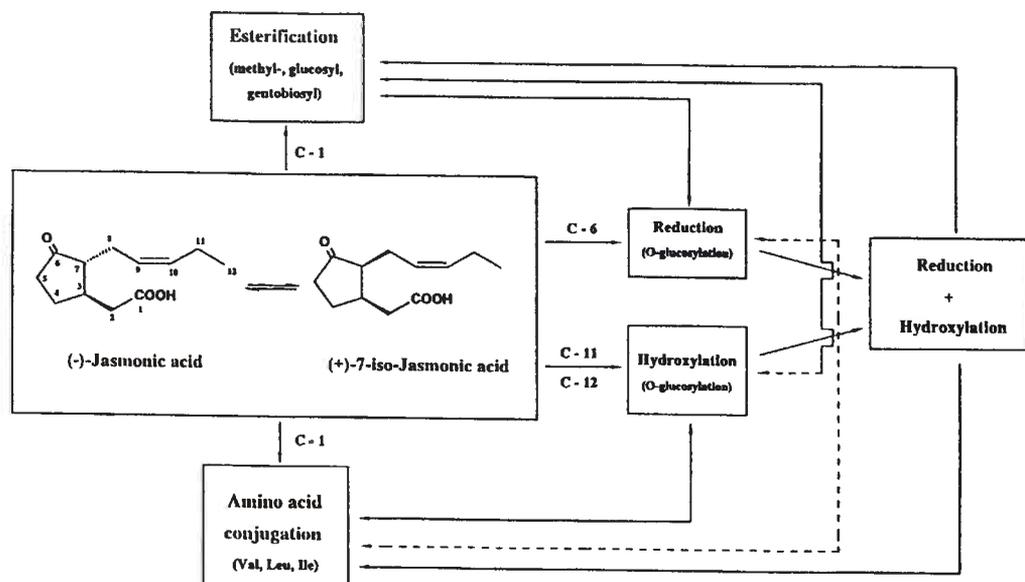


Fig. 4. Rutas metabólicas del ácido jasmónico.

HIPOTESIS GENERAL DEL TRABAJO DE TESIS

La tuberización es regulada por un balance endógeno entre giberelinas y jasmonatos. El aumento de los niveles endógenos de jasmonatos en estolones durante la ontogenia induce *per se* la expansión de las células meristemáticas y consecuentemente la formación del tubérculo.

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO DE TESIS

Estudiar las relaciones endógenas entre giberelinas y jasmonatos durante la ontogenia de la planta de papa (*Solanum tuberosum* L.), y su efecto sobre la regulación de la tuberización.

CAPITULO I

RELACIONES HORMONALES ENDOGENAS

INTRODUCCION

La tuberización es regulada en parte por factores ambientales como el fotoperíodo y la temperatura; días cortos y noches frías son condiciones promotoras de la tuberización, mientras que días largos retrasan el fenómeno (Koda et al., 1988). Al respecto, estos autores afirman que la respuesta al fotoperíodo interactúa con otros factores incluyendo genotipo, niveles de nitrógeno y edad del tubérculo madre. Los factores son recibidos por las plantas como "estímulos", los que luego son transformados en señales bioquímicas las cuales son transmitidas del sitio de percepción a las células blanco. Las señales son las inductoras de diferentes cascadas metabólicas resultando en una respuesta fisiológica determinada. Una de las señales bioquímicas más representativas son las fitohormonas (Koda, 1992).

Numerosos estudios han demostrado que los jasmonatos y giberelinas están involucrados en la tuberización de plantas de papa pero poco se sabe de los niveles endógenos basales de estas hormonas en los diferentes órganos y de las variaciones que puedan sufrir durante la ontogenia.

Las GAs juegan un papel importante en la iniciación de la estolonización, además de mantener el crecimiento diageotrópico de este órgano (Tizio, 1979; Harris, 1992). El crecimiento del estolón continúa mientras las condiciones sean desfavorables para la tuberización (Chapman, 1958). Pont Lezica (1970) y Railton y Wareing (1973) obtuvieron evidencia que los niveles de giberelinas en plantas de papa disminuían luego de ser transferidas de condiciones de DL a DC. Por otro lado, las GAs retardan la tuberización; esta aseveración es apoyada por algunos trabajos realizados en los que se ha aplicado GAs y observado una inhibición de la tuberización (Tizio, 1964a,b; 1966; 1979; Vreugdenhil y Helder, 1991); o bien se ha evaluado estimulación de la tuberización mediante la aplicación de retardantes del crecimiento que inhiben síntesis de GAs (Guiñazú et al., 1988; Abdala et al., 1995); también por la disminución del nivel endógeno de sustancias tipo giberelinas bajo condiciones favorables de tuberización (Racca y Tizio, 1968; Railton y Wareing, 1973). El ácido giberélico (GA_3) y otras GAs tales como A_1 , A_4 , A_5 , A_7 y A_9 han mostrado un efecto retardante de la tuberización tanto en planta entera como en

estacas foliosas (Tizio, 1964a,b; 1966; 1971), estolones cultivados *in vitro* y secciones de tallos y brotes (Tizio, 1964a,b; 1966; 1971).

Tal como mencionó Guiñazú et al. (1988) el contenido de sustancias tipo GAs en raíces de estacas foliosas de papa disminuye luego de ser regadas con CCC, provocando tuberización temprana. En raíces de estacas controles, el contenido de GAs fue relativamente alto y la tuberización se retrasó. Estos autores sugirieron la existencia de un "factor radical", sintetizado durante el crecimiento de las raíces, que retarda tuberización y sería una giberelina.

Abdala et al. (1995) identificaron y cuantificaron por GC-MS GA₃, iso-GA₃, GA₈, GA₂₀ y trazas de GA₁ como endógenas de raíces de papa. Asimismo estos autores señalaron una dramática disminución de GA₃ endógeno en raíces tratadas con CCC respecto a raíces controles. Por lo tanto, GA₃ podría constituir el hipotético "factor radical", y en consecuencia la alta concentración (345 ng) determinada en raíces controles podría ser responsable del retraso de la tuberización. Raíces tratadas con CCC contenían sólo 5 ng de GA₃ endógeno.

En contraste con el efecto retardante que tienen las giberelinas en la tuberización, ha sido reportado la aislación de una sustancia activa promotora de la misma (Koda y Okasawa, 1988; Koda et al., 1988). Esta sustancia aislada de hojas de la planta de papa fue identificada por Yoshihara et al. (1989) como 3-oxo-2-(5' β -D-glucopiranosido-2-cis-pentenil) cyclopentano-1-ácido acético. La sustancia es un glucósido y su aglucón (12-OH-JA) fue denominado ácido tuberónico (TA) el cual está estrechamente relacionado al ácido jasmónico (JA). JA posee una fuerte actividad inductora de tuberización en ausencia del sistema radical (Koda et al., 1991). Se ha encontrado también que la tuberización en plantas de batata (*Dioscorea batatas* Decne.) es controlada por JA (Koda y Kikuta, 1991) así también como en *Helianthus tuberosus* L. (Yoshihara et al., 1992), lo que indicaría que JA estaría involucrado en la tuberización de variadas especies.

El ácido jasmónico ha sido encontrado en todas las plantas superiores examinadas y en general se estima que se encuentra presente en concentraciones menores a 10 μ M (Mason et al., 1992). Los niveles de JA en los tejidos vegetales varía en función al tipo de tejido, desarrollo y estímulos externos

(Sembdner y Parthier, 1993; Koda, 1992).

Los niveles más altos han sido informados en flores y en tejidos reproductivos, mientras que niveles más bajos se encuentran en raíces y hojas maduras (Creelman y Mullet, 1995). En semillas y plántulas de soja, los niveles de JA son mayores en los tejidos jóvenes (Creelman y Mullet, 1995).

Koda (1997) informó que el nivel de JA en hojas de papa puede ser menor a $4 \text{ ng x g}^{-1} \text{ PF}$ al tiempo de comenzar la tuberización en plantas crecidas a campo.

Nuestro grupo de trabajo identificó y cuantificó ácido jasmónico por RIA y GC-MS en diferentes órganos (hojas, raíces, estolones y peridermis de tubérculos) de la planta de papa. Las concentraciones más altas de JA endógeno fue determinada en estolones antes del inicio de la tuberización. En follaje de papa en etapa de crecimiento se determinó un contenido endógeno de $14 \text{ ng x g}^{-1} \text{ PF}$ de JA y cabe señalar que en este trabajo el estándar interno se adicionó posterior a la extracción y purificación, por lo que es de suponer que los niveles endógenos son aún mayores (Abdala et al., 1996).

Además de la forma libre muchos amino-(S) conjugados endógenos de JA han sido encontrados: tirosina (Tyr), triptófano (Trp), y fenilalanina (Phe) en flores de haba (Brückner et al., 1988), isoleucina (Ile) en frutos así también como leucina (Leu) y valina (Val) en hojas jóvenes de esta misma planta (Schmidt et al., 1990). Krumm y Boland (1996) proponen que la coronatina, una fitotoxina producida por *Pseudomonas spp*, está estructuralmente relacionada con el conjugado de isoleucina de JA y tiene actividad inductora en la tuberización.

HIPOTESIS

La tuberización es un evento morfogénico regulado tanto por factores externos como internos. Si las condiciones ambientales son inductivas y las concentraciones de JA se mantienen en niveles activos durante la ontogenia debe existir un equilibrio interno con GAs para no desencadenar la tuberización temprana.

OBJETIVOS

Analizar la relación endógena entre GAs y JA durante la brotación, crecimiento, estolonización y tuberización de la planta de papa, en condiciones fotoperiódicas de 15 hs de luz. Para ello se procedió a:

1. Identificar y cuantificar JA por GC-MS en las fases mencionadas con el objeto de establecer correlaciones entre estos compuestos y la promoción de la tuberización.
2. Identificar y cuantificar GAs por GC-MS en las fases mencionadas con el objeto de establecer correlaciones entre estos compuestos y el retardo de la tuberización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. *Spunta*, calibrados a 150 - 250 g de peso, se plantaron en bolsas de polietileno de 40 cm de alto por 25 de diámetro y se mantuvieron en invernáculo. El ensayo se condujo bajo las siguientes condiciones: termoperiodicidad a la fecha de plantación (agosto) 12°C a 30°C y a la fecha de entrega o senescencia de las plantas (diciembre) 18 - 38°C; fotoperíodo a la fecha de plantación 14 - 15 hs de luz.

Previo al momento de la plantación de los tubérculos se realizó la extirpación de yemas en estado de dormición, y posteriormente yemas en ruptura de dormición. Luego, al comienzo de brotación se recolectaron brotes de 1 - 5 mm como primera muestra, y al cabo de unos días brotes que habían alcanzado 1 cm de longitud. Cuando las plantas se encontraban en crecimiento se recolectó follaje (incluyendo talluelos, hojas y pecíolos) y raíces. A la aparición de estolones (fase de estolonización) se recolectó follaje, raíces y estolones.

Se obtuvieron muestras de los distintos órganos en cada etapa ontogénica

en dos experimentos realizados en dos años consecutivos y se aplicaron distintas técnicas de extracción y purificación de hormonas.

Extracción, purificación y determinación de jasmonatos

Experimento 1

La extracción de JA se realizó homogeneizando 1 g de PF de tejido en 50 ml de MeOH 100%, luego se mantuvo en heladera durante una noche a 4°C. Posteriormente se filtró y se descartó el residuo, evaporando el solvente a sequedad.

El extracto seco fue disuelto con 200 µl de MeOH 100% y colocado lentamente sobre una mini-columna de C₁₈ (Merck Lichrolut RP-18) eluída con una mezcla A (MeOH en 2% de AcOH) y B (H₂O) siguiendo un gradiente de 20 a 100% para A y de 80 a 0% para B.

Las primeras tres fracciones fueron descartadas. En las fracciones 4 - 5 se recolectó JA libre, y en la 6 - 7 JA conjugado; los precursores del JA eluyeron en las fracciones 8 - 9.

HPLC

Las fracciones se analizaron por HPLC en columna C₁₈ (Eurospher 100,5 m) con una mezcla isocrática de MeOH acuoso 60% en 0.1% de H₃PO₄, recolectándose fracciones de 1ml min⁻¹. Los eluidos correspondientes al Rt de D₆-JA (9.2 min) fueron derivatizados mediante el agregado de 1 ml de agua, 1 ml de cloroformo y pequeña cantidad de ácido cítrico. Esta mezcla se mantuvo una noche a 4°C ; posteriormente se separó el cloroformo y una alícuota se inyectó en el cromatógrafo gaseoso - espectrómetro de masa a fin de identificar y cuantificar JA.

Experimento 2

La extracción de JA se realizó homogeneizando 1 g de PS de cada tejido con 5 ml de MeOH. Este homogeneizado se transfirió a un vaso de precipitado

lavando con 5 ml adicionales de MeOH, y se agregó 200 ng de D₆-JA; luego se procedió a homogeneizar en ultra-turrax.

Posteriormente se filtró sobre columna con filtro de celulosa y el sobrenadante se vertió lentamente en una columna de DEAE-Sephadex A-25 previamente lavada con 5 ml de MeOH en 1 N AcOH y 10 ml de MeOH.

En este momento se colocó la muestra y se procedió a eluir la columna con 3 ml de MeOH, 3 ml de MeOH en 0.1 N de AcOH, 5 ml de MeOH en 1 N de AcOH. En esta última fracción eluye el JA libre por lo tanto se recolectó y se evaporó a sequedad. Posteriormente se continuó la purificación del compuesto mediante microcolumnas de C₁₈ tal lo descrito anteriormente.

HPLC

El extracto seco se diluyó con 70 μ l de MeOH con el objeto de disolver la muestra, luego se agregó 40 μ l de agua a fin de alcanzar la proporción del solvente inicial de corrida, adecuado para la inyección.

Luego se procedió a inyectar la muestra en el inyector del HPLC el cual se encuentra acoplado a un detector UV a 210 nm. Para la corrida cromatográfica se usó una columna Eurospher 100, 5 μ m, y una mezcla isocrática de 60% MeOH + 40% de agua en 0.2% de AcOH a una tasa de flujo de 1 ml . min⁻¹.

Posteriormente se procedió a recolectar las fracciones que eluyen a los minutos 7-10, la cual se evaporó.

En la Fig. 6 se muestra un ejemplo del análisis realizado por HPLC para la purificación y separación de JA en muestra de raíces.

Para el análisis por GC-MS la derivatización se realizó con diazometano durante 20 min. Previamente al agregado de diazometano se adicionó 50 ng de DHJA estándar a fin de verificar si la metilación fue correcta. Luego se evaporó y se procedió al análisis por GC-MS.

GC-MS

Los análisis fueron realizados con un espectrómetro de masa Hewlett Packard, modelo 5970B combinado con un cromatógrafo de gases HP 5890. La cromatografía gaseosa se realizó sobre columna de 25 m x 0.2 mm de diámetro,

usándose gas helio como "carrier". La temperatura de inyección fue de 275°C. El programa de temperatura fue el siguiente: de 60°C (1 min) a 180°C (30°C . min⁻¹); de 180°C (1min) a 200°C (10°C min⁻¹); de 200°C (1min) a 270°C (5°C min⁻¹). La energía del impacto de electrones fue de 70 eV.

En la Fig. 7 se muestra un ejemplo del análisis realizado por GC-MS para la identificación y cuantificación de JA en follaje y raíces.

Extracción, purificación, identificación y cuantificación de giberelinas

Experimento 1

Los tejidos analizados se congelaron inmediatamente después de cosechados. La extracción de GAs endógenas se realizó a partir de 1 g de PS de tejido molido en MeOH acuoso al 80%. En esta etapa (³H-GA₃), (²H-GA₃) y (²H-GA₁) giberelinas fueron adicionadas como estándares internos.

La purificación de los extractos se realizó por cromatografías secuenciales en C₁₈ y SiO₂; esta última con el objeto de separar las GAs libres de las formas conjugadas.

La fracción conteniendo las GAs libres fue sometida a Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) sobre una columna de C₁₈ (15 cm x 8 mm) utilizando un equipo KONIK MODEL KNK-500 . El programa de solvente fue: 0 a 30 min gradiente lineal de 37% MeOH a 100% MeOH en 0.1% de AcOH, con un flujo de 2 ml . min⁻¹.

Experimento 2

La extracción de GAs endógenas se realizó a partir de 1 g de PS de tejido molido en MeOH acuoso al 80%. En esta etapa (³H-GA₃), (²H-GA₃) y (²H-GA₁) giberelinas fueron adicionadas como estándares internos.

El homogeneizado se dejó toda una noche a 4°C. Posteriormente se filtró y se reextrajo con MeOH 100%. El extracto se evaporó a sequedad.

La purificación se realizó en una columna de SiO₂ previamente lavada con 3 volúmenes de hexano (5 ml).

La columna se eluyó con tres volúmenes de hexano y las fracciones recolectadas se descartaron. Posteriormente se eluyó con tres volúmenes de EtoAc 2.5% / hexano 97.5% (99); AcOH (1), dos volúmenes de EtoAc 5% / hexano 95% (99); AcOH (1) y dos volúmenes de EtoAc 15% / hexano 85% (99); AcOH (1), los cuales fueron recolectados en un balón conteniendo los precursores de GAs. Luego la elución continuó con un volumen de EtoAc 15% / hexano 85% (99); AcOH (1), cuatro volúmenes de EtoAc 50% / hexano 50% (99); AcOH (1) y dos volúmenes de EtoAc 99% hexano 1% (99); AcOH (1), donde se recolectaron las GAs libres. Las formas conjugadas fueron recolectadas con la elución de tres volúmenes de MeOH 99% / AcOH 1%.

La fracción libre fue evaporada a sequedad y retomada con MeOH (250 ml) y H₂O hasta completar un volumen de columna de DEAE Sephadex A-25. El extracto fue ajustado a pH 8 con el objeto de ionizar las GAs. La columna se eluyó con tres volúmenes de H₂O a pH 8 y siete volúmenes de AcOH 1M.

La fracción neutra obtenida con agua fue descartada y el eluido ácido se purificó en columna de C₁₈ previamente acondicionada con MeOH y AcOH (6%). La columna de C₁₈ se eluyó con 5 ml de MeOH 80%. La fracción obtenida fue evaporada.

La fracción conteniendo las GAs libres fue sometida a Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) sobre una columna de C₁₈ (15 cm x 8 mm) utilizando un equipo KONIK MODEL KNK-500. El programa de solvente fue: 0 a 30 min gradiente lineal de 37% MeOH a 100% MeOH en 0.1 % de AcOH, con un flujo de 2 ml x min⁻¹, recolectándose fracciones cada 2 min entre los tiempos de retención de 0 a 30 min.

Bioensayo

Una vez separadas las GAs se evaluó su actividad biológica mediante el ensayo de arroz (*Oryza sativa*) enano cv. Tan-gibonzu (Murakami, 1968).

Las semillas se incubaron en un baño a 32°C durante 48 hs. Luego de pregerminadas se sembraron en vasos plásticos (70 ml) en un soporte de agar 0.7 % a razón de 8 semillas por vaso. Después de 48 hs de crecimiento en cámara de cultivo con una intensidad lumínica de 2500 lux, a 32°C y 100% de HR, se

seleccionaron 6 plántulas de tamaño uniforme.

Las fracciones obtenidas del HPLC se retomaron con etanol 96% (dilución 1/50) y una microgota de 0.5 µl de dicha solución se aplicó sobre la lámina de la primera hoja de la plántula de arroz. El mismo procedimiento se realizó posteriormente para cada fracción con una dilución 1/200. A las 72 hs de aplicada la microgota se midió el crecimiento en mm del primer entrenudo.

Las fracciones obtenidas del HPLC que mostraron actividad giberelínica en los bioensayos, se analizaron por Cromatografía Gaseosa-Espectrómetro de Masa a fin de proceder a su identificación y cuantificación.

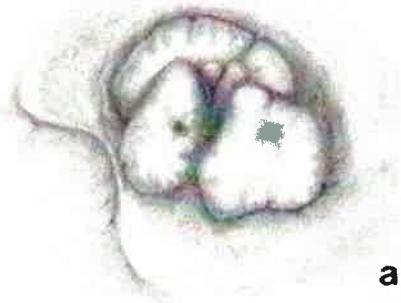
Experimento 1

Etapas de muestreo		Fecha
<u>Tubérculo madre</u>		
Yemas no brotadas	(Yema I) (Fig 1, A)	21/08
Brotación múltiple	(Yemas II)	04/09
<u>Planta</u>		
Inicio brotación	brotes de 1 a 5 mm de longitud (Brote I)	07/09
Plena brotación	brotes de 1 cm de longitud (Brote II) (Fig. 1 B)	01/09
Inicio crecimiento	tallos y primeras hojas verdaderas (Follaje I) (Fig. 1 C)	25/09
Pleno crecimiento	tallos y hojas (Follaje II) raíces (Raíces II)	02/10 02/10
Inicio estolonización	tallos y hojas (Follaje III) raíces (Raíces III) estolones (Estolones III)	18/10 18/10 18/10
Ensanchamiento estolón	tallos y hojas (Follaje IV) raíces (Raíces IV) estolones (Estolones IV)	25/10 25/10 25/10

Inicio de tuberización	tallos y hojas (Follaje V)	02/11
	raíces (Raíces V)	02/11
	estolones (Estolones V)	02/11
	tubérculos (Tubérculos V)	02/11

Experimento 2

Etapas de muestreo		Fecha
<u>Tubérculo madre</u>		
Yemas no brotadas	(Yema I) (Fig. 1 A)	27/08
Brotación múltiple	(Yemas II)	02/09
<u>Planta</u>		
Brotación	(Brote) (Fig. 1 B)	11/09
Inicio crecimiento	tallos y primeras hojas verdaderas	
	(Follaje I)	25/09
Pleno crecimiento	tallos y hojas (Follaje II)	02/10
	raíces (Raíces II)	02/10
Inicio estolonización	tallos y hojas (Follaje III)	22/10
	raíces (Raíces III)	22/10
	estolones (Estolones III)	22/10
Inicio tuberización	tallos y hojas (Follaje III)	05/11
	raíces (Raíces III)	05/11
	estolones (Estolones III)	05/11
	tubérculos	05/11
Tuberización avanzada	tallos y hojas (Follaje III)	15/12
	raíces (Raíces III)	15/12
	estolones (Estolones III)	15/12
	tubérculos	15/12



a



b



c

Fig. 1. *Solanum tuberosum* L. cv. *Spunta*. a: yemas, b: brotes, c: detalle del follaje.



Fig. 2. Planta de *Solanum tuberosum* L. en etapa de pleno crecimiento.

RESULTADOS

En la Tabla 1 (Experimento 1) y en la Tabla 2 (Experimento 2) se resumen las cuantificaciones de JA endógeno.

Tabla 1. Ácido jasmónico endógeno (ng . g⁻¹ PF) de órganos individuales de la planta de papa durante las etapas ontogénicas.

Ontogenia	Organos					
	Yema	Brote	Follaje	Raíz	Estolón	Tubérc.
Yemas no brotadas	38.2					
Yemas brotadas	15.9					
Brotes I		30.7				
Brotes II		14.6				
Inicio del Crecimiento			15.3			
Pleno Crecimiento			58.6	41.0		
Inicio de Estolonización			27.4	50.7	25.7	
Estolón Ensanchado			67.6	81.7	14.2	
Inicio de Tuberización			20.4	33.6	21.9	14.7

Las yemas no brotadas extirpadas del tubérculo madre contienen una concentración relativamente alta de JA, el que posteriormente disminuye con la brotación. En los brotes de 1 a 5 mm de longitud (Brote I) se encontró un pico de JA de igual magnitud que el determinado en las muestras correspondientes a yemas no brotadas, el que también disminuye cuando los brotes crecen y alcanzan 1 cm de longitud.

En el Experimento 2, Tabla 2, los valores en yemas no difirieron entre el estado de no brotadas y brotadas. En este experimento también se observó disminución de la concentración de JA en brotes comparada con la concentración en yema.

Durante el transcurso de la ontogenia de la planta los niveles más altos de JA en hoja se encontraron en pleno crecimiento para luego disminuir hacia la estolonización, observándose luego un incremento durante el ensanchamiento del estolón (Tablas 1 y 3) o el inicio de la tuberización (Tablas 2 y 4).

Tabla 2. Ácido jasmónico endógeno (ng . g⁻¹ PS) de órganos individuales de la planta de papa durante las etapas ontogénicas.

Ontogenia	Organos					
	Yema	Brote	Follaje	Raíz	Estolón	Tubérc.
Yemas no brotadas	325.0					
Yemas brotadas	454.0					
Brotes I		164.0				
Inicio del Crecimiento			281.2	95.2		
Pleno Crecimiento			152.8	125.6		
Estolón Ensanchado			111.6	118.0	6.8	
Inicio de Tuberización			130.8	322.0	180.4	14.0
Tuberización Avanzada			82.0	215.6	42.0	11.2

Tabla 3. Índice de concentración de ácido jasmónico (cociente entre concentración de JA en el órgano y concentración total de JA en la planta).

Ontogenia	Organos			
	Follaje	Raíz	Estolón	Tubérculo
Pleno Crecimiento	0.58	0.41		
Inicio de Estolonización	0.26	0.49	0.25	
Estolón Ensanchado	0.41	0.50	0.09	
Inicio de Tuberización	0.20	0.33	0.32	0.145

Tabla 4. Índice de concentración de ácido jasmónico (cociente entre concentración de JA en el órgano y concentración total de JA en la planta).

Ontogenia	Organos			
	Follaje	Raíz	Estolón	Tubérculo
Inicio del Crecimiento	0.74	0.25		
Pleno Crecimiento	0.54	0.45		
Estolón Ensanchado	0.47	0.49	0.03	
Inicio de Tuberización	0.20	0.49	0.29	0.02
Tuberización Avanzada	0.23	0.61	0.12	0.03

El nivel endógeno de JA al inicio del crecimiento (Follaje I) en el Experimento 1 se mantuvo constante, y cuando la planta se encontraba en pleno crecimiento hubo un marcado aumento de JA en follaje (Follaje II), que después disminuyó en la etapa de estolonización.

Las raíces en cambio aumentan los niveles de JA progresivamente durante la ontogenia y al igual que en hojas se observa un pico durante el ensanchamiento del estolón o al inicio de la tuberización (Tablas 1 y 2).

En los estolones se determinaron dos picos de JA uno al inicio de la estolonización y otro al inicio de la tuberización (Tabla 1). Los niveles de JA en estolones durante su ensanchamiento son extremadamente bajos y aumentan significativamente durante el inicio de la tuberización (Tabla 2), pero cuando el estolón se transforma en tubérculo la concentración de JA en este tejido alcanza valores tan bajos como 14 ng x g^{-1} .

Con respecto a Me-JA (Tabla 5) el comportamiento es similar al de la forma libre, disminuye durante la ontogenia en hojas y aumenta en raíces, obteniéndose el mayor pico durante el ensanchamiento del estolón. En cambio Me-JA en los estolones aumenta progresivamente durante el desarrollo del tubérculo.

Tabla 5. Metil jasmónico endógeno ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ PF) de órganos individuales de la planta de papa durante las etapas ontogénicas.

Ontogenia	Organos			
	Follaje	Raíz	Estolón	Tubérculo
Inicio de Estolonización	41.5	25.1	8.5	
Estolón Ensanchado	13.6	72.2	20.6	
Inicio de Tuberización	9.7	38.8	21.9	14.7

Mediante la técnica de extracción, purificación y cuantificación utilizada no pudieron ser detectados conjugados de aminoácidos con JA en los diferentes órganos (follaje, raíces, estolones y tubérculos) en los tres estadíos analizados (inicio de estolonización, ensanchamiento del estolón e inicio de tuberización).

En cuanto a las GAs, la concentración de GA₃ en brotes fue de 31.6 ng x g⁻¹ PS disminuyendo a 10.5 ng x g⁻¹ PS en follaje en pleno crecimiento, mientras que en raíces se determinó elevado nivel de GA₃. El nivel de GA₁ fue en general muy bajo en relación a GA₃, con una máxima concentración en follaje en la etapa de pleno crecimiento (Tabla 6).

En consecuencia baja concentración de JA en brotes (14.6 ng) coinciden con alta concentración de GA₃ (31.6 ng), concentraciones más bajas de GA₃ (10.5 ng) y más elevadas de GA₁ (6.4 ng) en follaje en pleno crecimiento se correlacionan con altos niveles de JA (58.6 ng), y por último altas concentraciones de GA₃ en raíces (55.2 ng) coinciden con concentraciones más bajas de JA (41 ng).

La evaluación de la actividad biológica mediante el ensayo de arroz enano indicó picos de actividad giberelínica en brotes II (Fig. 3), follaje II (Fig. 4) y raíces II (Fig. 5) del Experimento 1. Los análisis por GC-MS arrojaron altas concentraciones de GA₃ en raíces en la etapa de pleno crecimiento y trazas de GA₁. En brotes la concentración de GA₃ fue también alta y la de GA₁ fue similar a la de raíces. Los niveles de GA₃ fueron menores en hojas pero aumentó la concentración de GA₁ (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación y cuantificación de giberelinas durante la ontogenia de la planta de papa. Valores expresados en ng . g⁻¹ PS de tejido.

	Estadios Ontogénicos								
	Brotación	Crecimiento		Estolonización	Tuberización				T. Avanzada
	Brote	Follaje	Raíz	Follaje	Follaje	Raíz	Est	Tub	Follaje
GA ₃	31.6	10.5	55.2	203	676	3612	308	157	253
GA ₁	3.3	6.4	3.5	17	45	290	19	10	19
GA _{1/3}	0.10	0.60	0.06	0.08	0.07	0.08	0.06	0.06	0.07

El extracto de follaje contuvo por lo menos tres compuestos tipo GAs, con un espectro consistente con las GAs di-hidro-tri-hidroxi C₁₉. Ninguno de estos

compuestos son GAs conocidas. También se hallaron GAs tipo tri-hidroxi (posiblemente GA₈) y otra GA (posiblemente de M+ 506). Esta última corrió en el tiempo de retención esperado para GA₂₉.

En brote se encontraron por lo menos dos de las GAs desconocidas presentes en follaje, y tres compuestos tipo GAs tri-hidroxi C₁₉ posiblemente GA₈.

En el Experimento 2 se encontraron picos de actividad giberelínica en follaje al inicio del crecimiento (Fig. 8), al inicio de estolonización (Fig. 10), inicio de tuberización (Fig. 11) y tuberización avanzada (Fig. 13). En raíces se encontró actividad en la etapa de pleno crecimiento (Fig. 9) y en la iniciación de la tuberización (Fig. 11). En estolones y tubérculos hubo actividad al inicio de la tuberización (Fig. 12). No encontramos bioactividad en follaje en pleno crecimiento (Fig. 9) ni en raíces al inicio de estolonización (Fig. 10).

Tabla 7. Índice de la concentración de hormonas durante la etapa de pleno crecimiento (cociente entre concentración de fitohormona en el órgano y concentración total de fitohormona en la planta).

Organos	Fitohormonas		
	JA	GA ₃	GA ₁
Follaje	0.59	0.16	0.65
Raíces	0.41	0.84	0.35

Con respecto a la distribución de las fitohormonas en los diferentes órganos los índices tomados como porcentaje de la concentración de hormona en un órgano respecto a la concentración total de hormona en la planta, indican que JA y GA₁ en pleno crecimiento poseen el mismo patrón de distribución, observándose el mayor índice de concentración en follaje (Tabla 7) a diferencia de lo que ocurre con GA₃ donde el mayor índice se encuentra en raíces.

Al inicio de la tuberización (Tabla 8) el patrón de distribución de hormonas en los distintos órganos se modifica observándose para ambas giberelinas un mayor índice de concentración en raíces y un muy bajo índice en estolones. A diferencia de lo que ocurre en pleno crecimiento el índice de concentración de JA en follaje disminuye para aumentar en estolones, mientras que el índice de

concentración en raíces permanece constante.

Tabla 8. Índice de la concentración de hormonas durante la etapa de inicio de la tuberización (cociente entre concentración de fitohormona en el órgano y concentración total de fitohormona en la planta).

Organos	Fitohormonas		
	JA	GA ₃	GA ₁
Follaje	0.20	0.14	0.12
Raíces	0.49	0.75	0.79
Estolones	0.29	0.06	0.05
Tubérculos	0.02	0.03	0.02

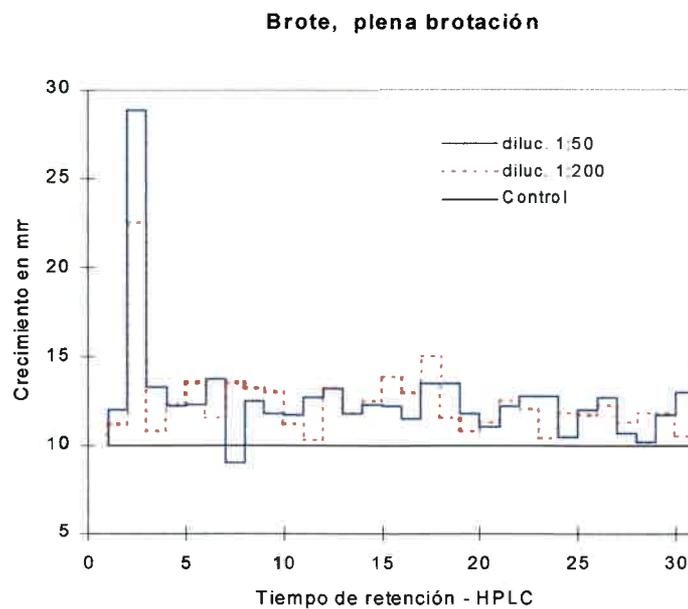


Fig. 3. Niveles de giberelinas libres de brotes de 1 cm de longitud, evaluadas por el bioensayo del arroz enano cv. Tangibonzu. Ordenada: longitud del primer entrenudo en mm. Abscisa: tiempo de retención en HPLC.

Follaje, planta en pleno crecimiento

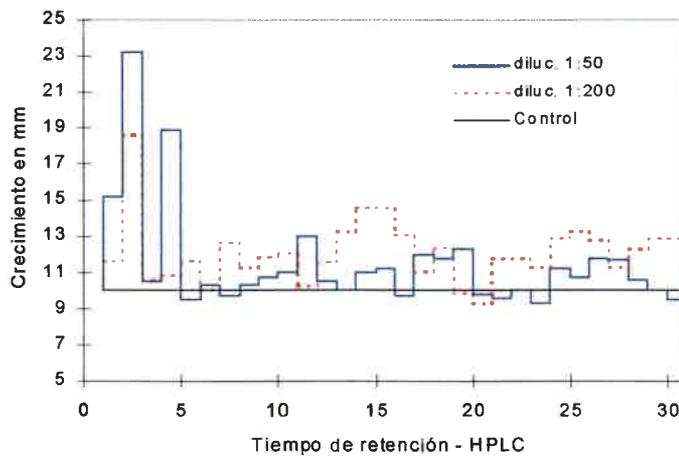


Fig. 4. Niveles de giberelinas libres de follaje en etapa de pleno crecimiento, evaluadas por el bioensayo del arroz enano cv. Tangibonzu. Ordenada: longitud del primer entrenudo en mm. Abscisa: tiempo de retención en HPLC.

Raíz, planta en pleno crecimiento

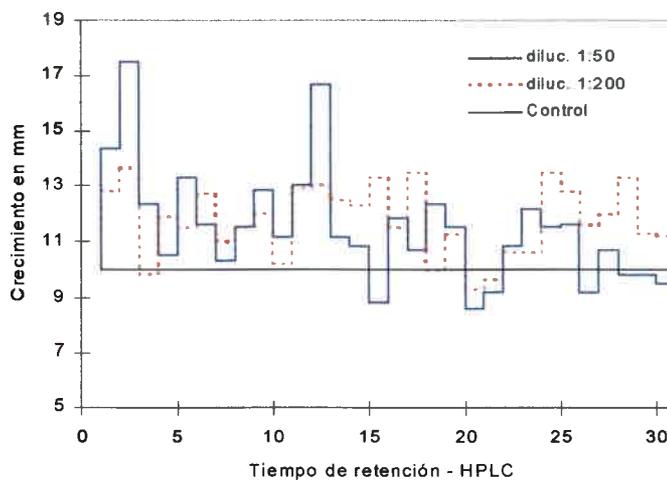


Fig. 5. Niveles de giberelinas libres de raíces en etapa de pleno crecimiento, evaluadas por el bioensayo del arroz enano cv. Tangibonzu. Ordenada: longitud del primer entrenudo en mm. Abscisa: tiempo de retención en HPLC.

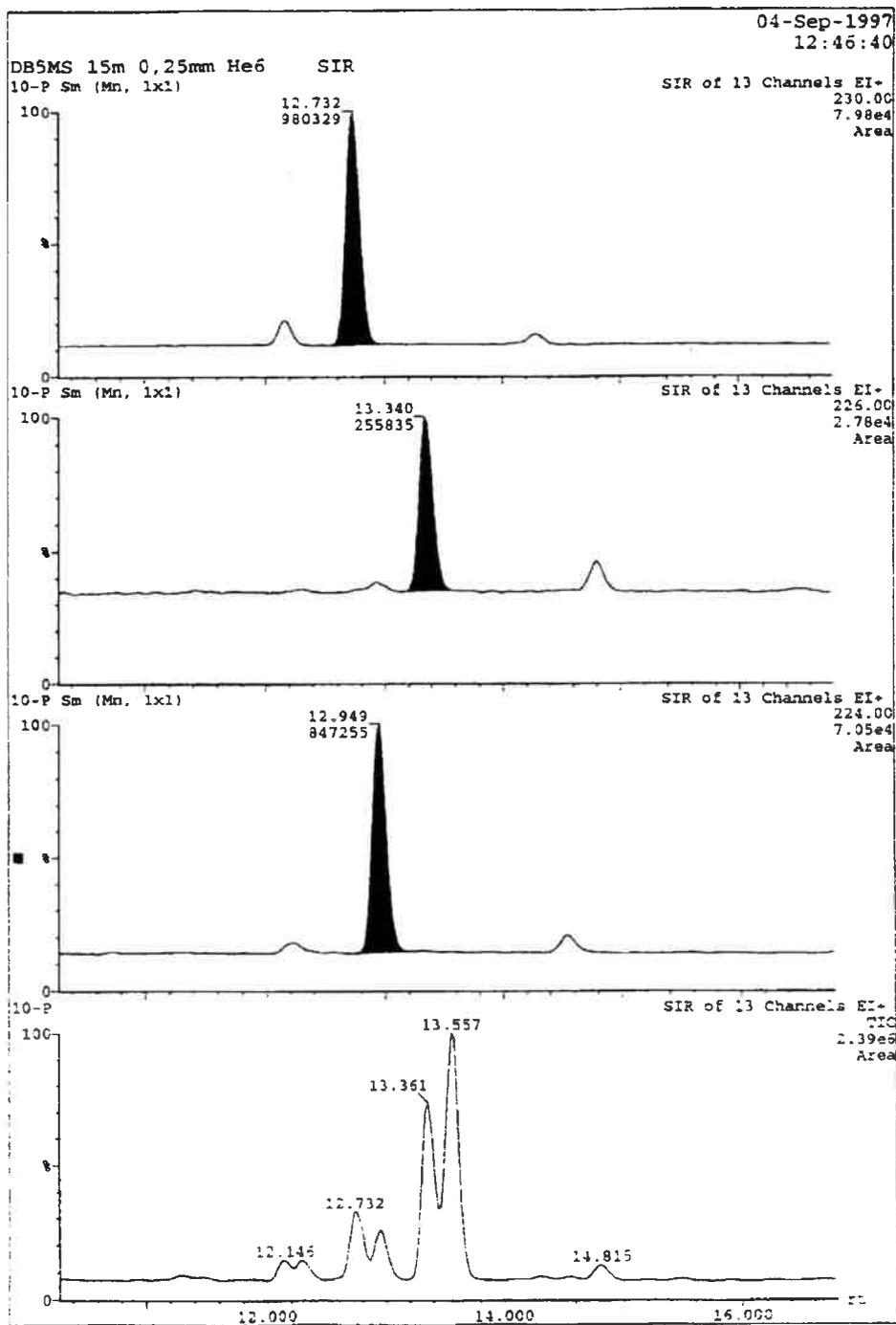


Fig. 6. Ejemplo de una corrida cromatográfica en HPLC para la purificación y separación de JA. La línea inferior corresponde a los estándares 11-12-di-hidro-JA y éster de Me-JA. Muestra de raíces.

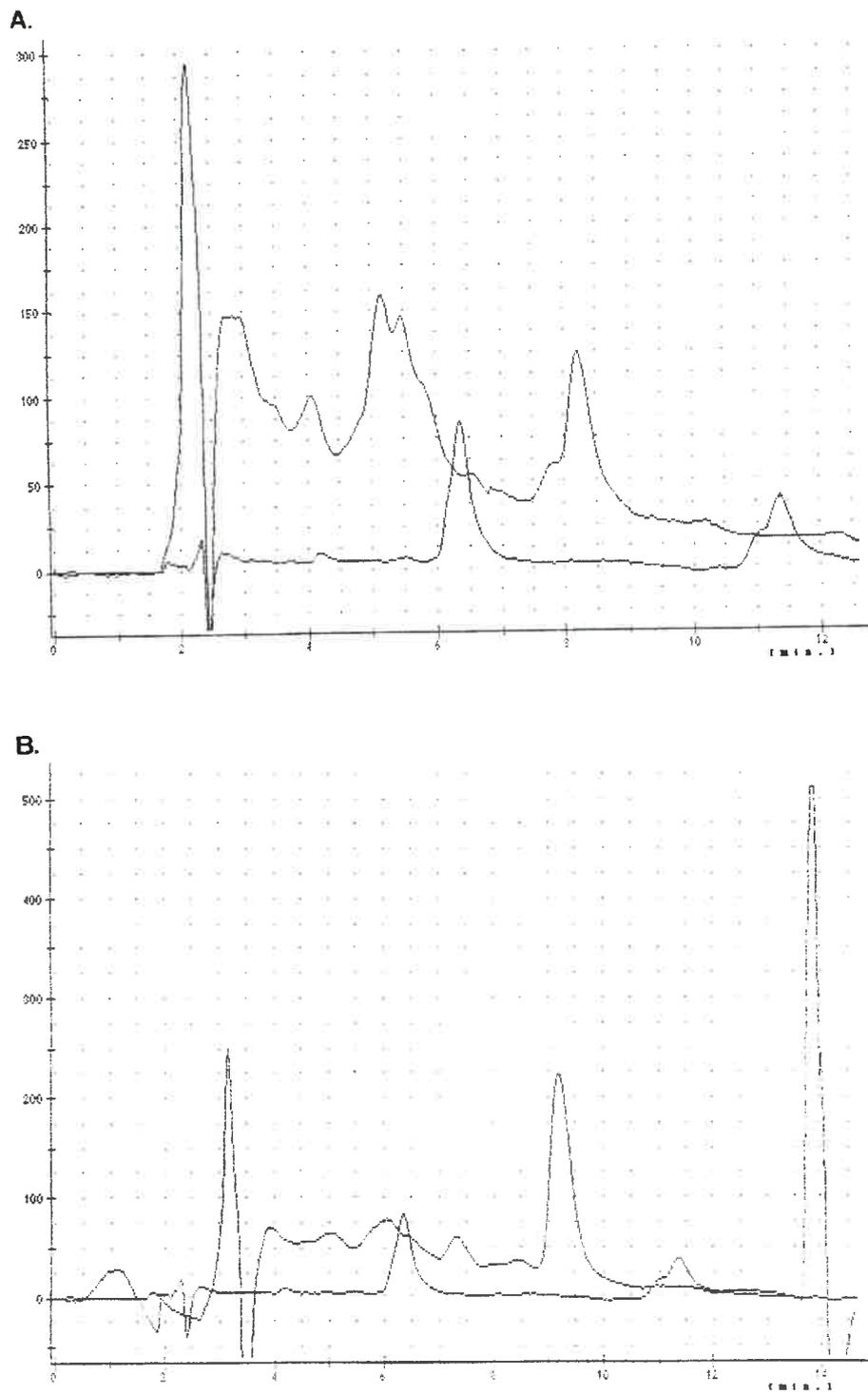


Fig. 7. Ejemplo de un análisis en GC-MS para la identificación y cuantificación de JA. **A.** Muestra de follaje. **B.** Muestra de raíces.

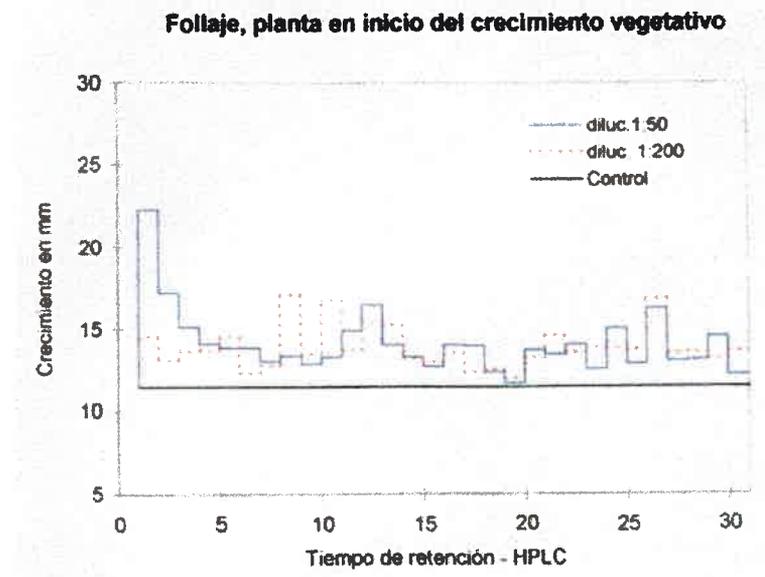


Fig. 8. Niveles de giberelinas libres de follaje de plantas en inicio de crecimiento vegetativo, evaluadas por el bioensayo de arroz enano cv. Tangibonzu.

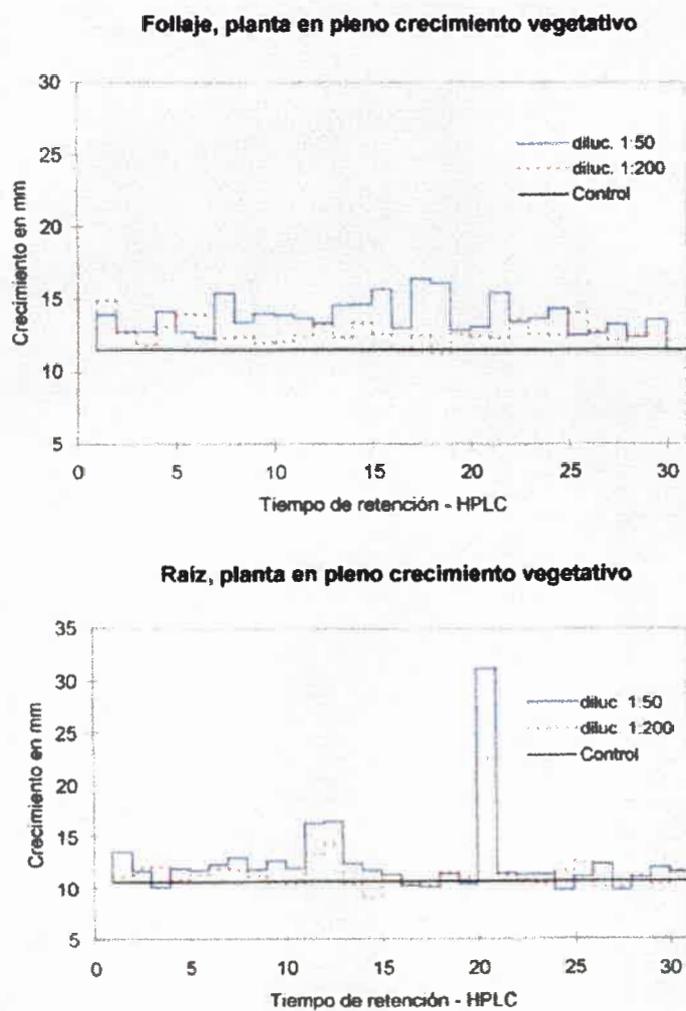


Fig. 9. Niveles de giberelinas libres de follaje y raíces de plantas en pleno crecimiento vegetativo, evaluadas por el bioensayo de arroz enano cv. Tangibonzu.

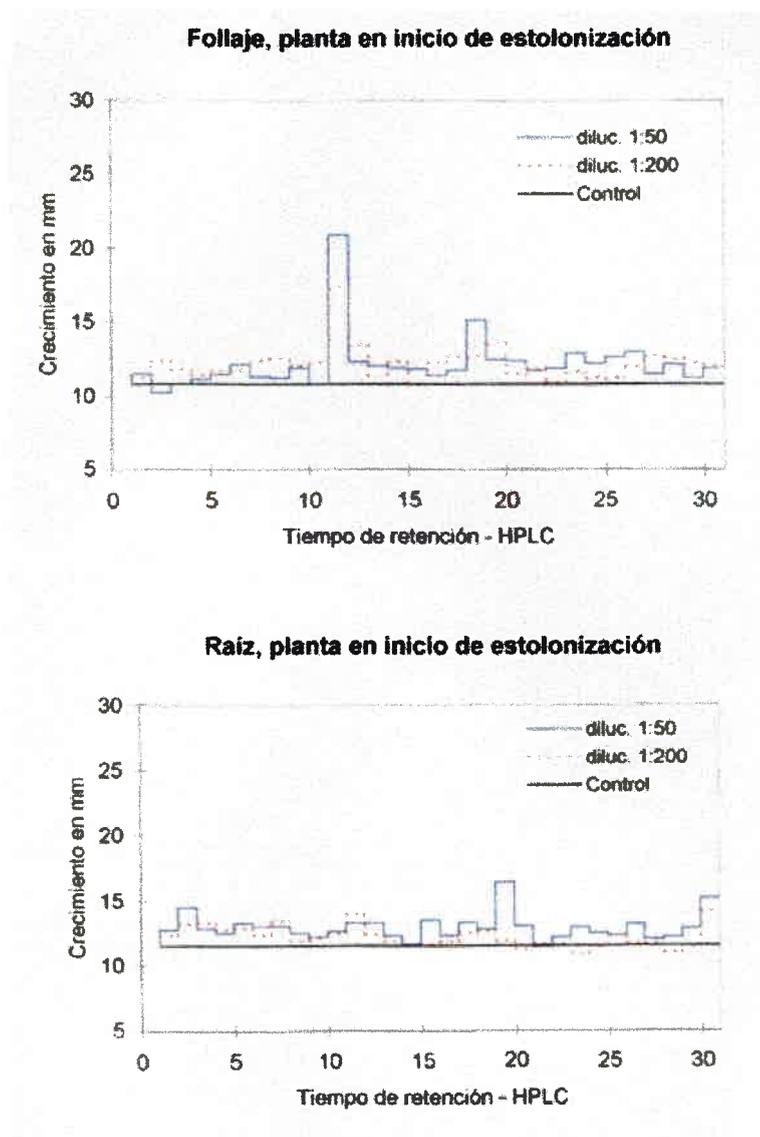


Fig. 10. Niveles de giberelinas libres de follaje y raíces de plantas en inicio de estolonización, evaluadas por el bioensayo de arroz enano cv. Tangibonzu.

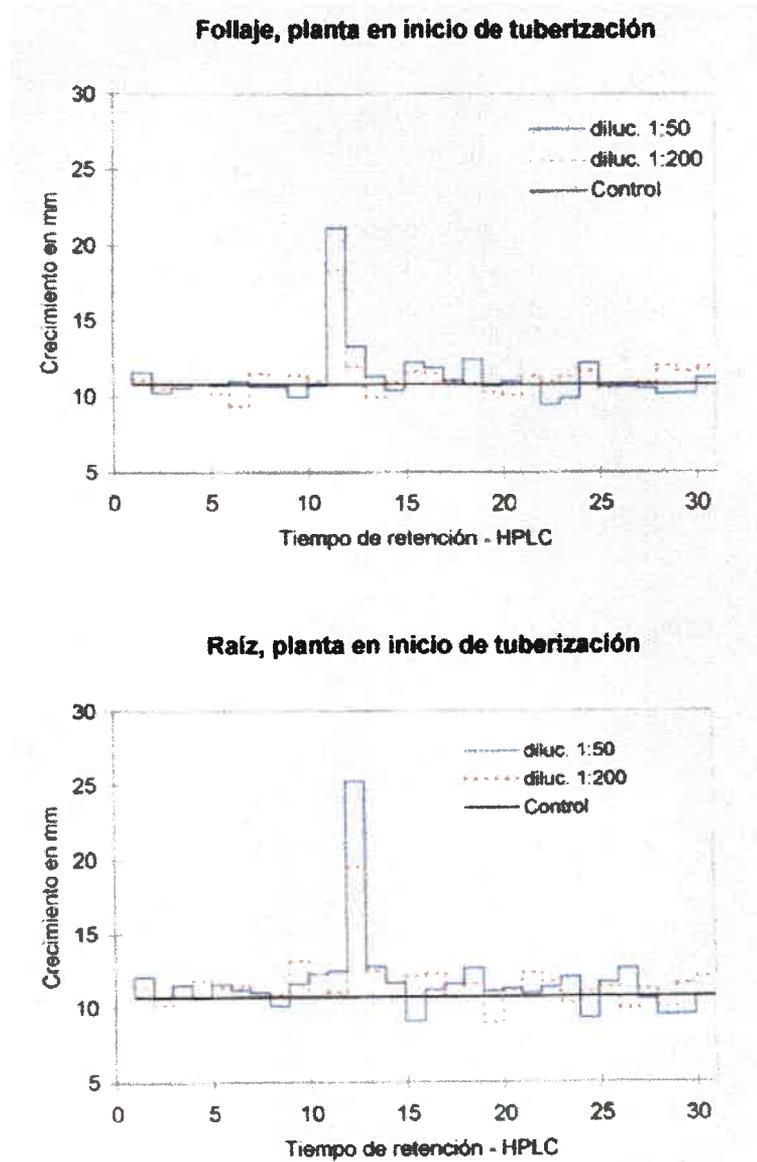


Fig. 11. Niveles de giberelinas libres de follaje y raíces de plantas en inicio de tuberización, evaluadas por el bioensayo de arroz enano cv. Tangibonzu.

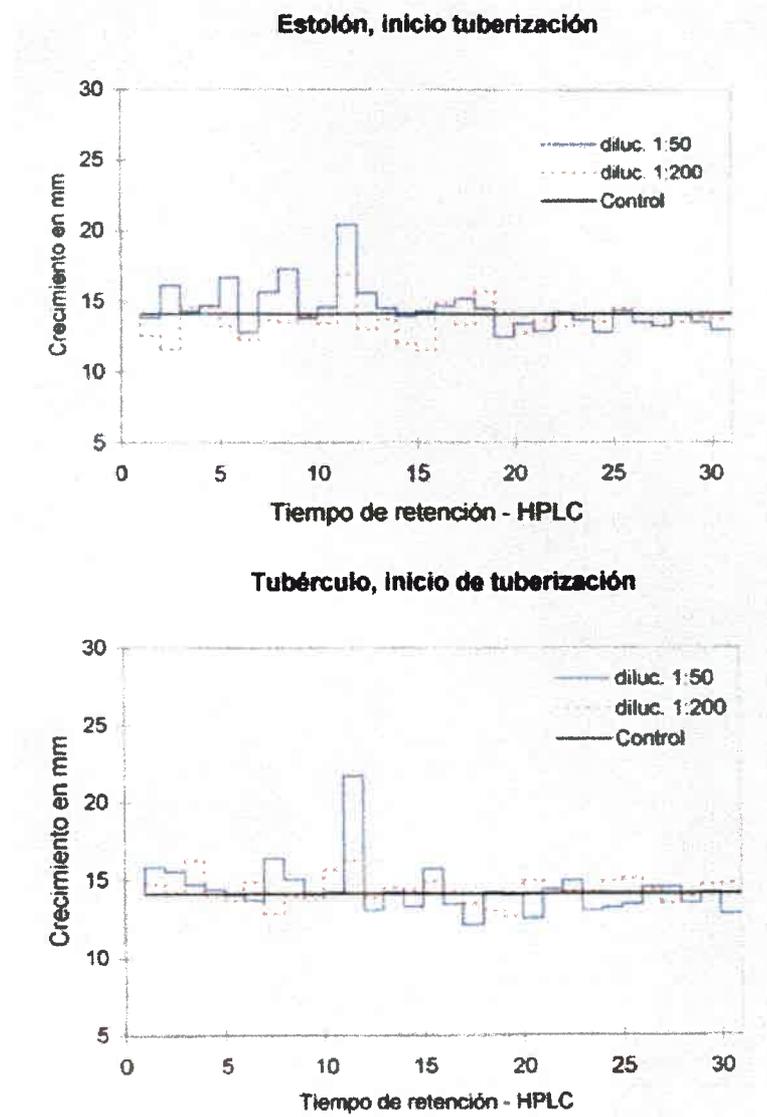


Fig. 12. Niveles de giberelinas libres de estolones y peridermis de tubérculos de plantas en inicio de tuberización, evaluadas por el bioensayo de arroz enano cv. Tangibonzu.

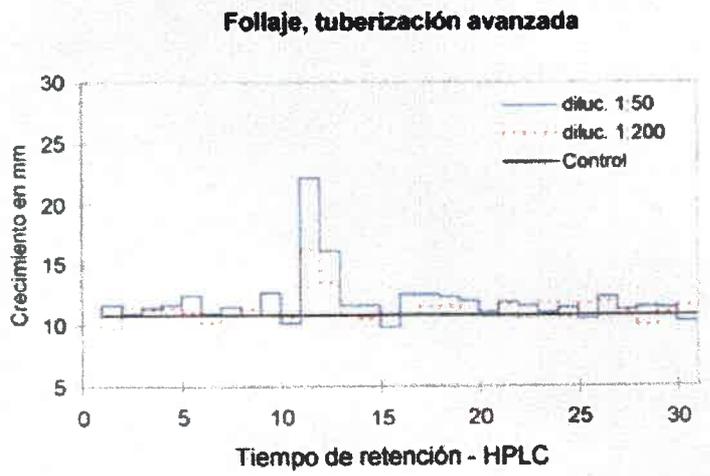


Fig. 13. Niveles de giberelinas libres de follaje de plantas en tuberización avanzada, evaluadas por el bioensayo de arroz enano cv. Tangibonzu.

DISCUSIÓN

El crecimiento y la iniciación de la tuberización en plantas de papa es un fenómeno muy estudiado aunque no totalmente comprendido (Machackova et al., 1997).

Años atrás fue aislado un factor inductor de tuberización específico y caracterizado como 3-oxo-2-(Δ -5- β - D-glucopiranosoloxo-2-cis-pentenil)-ciclopentano-1-ácido acético, una sustancia estructuralmente relacionada al JA (Yoshihara et al., 1989).

JA y Me-JA son reguladores naturales del desarrollo de plantas superiores, de respuestas a estímulos externos y de la expresión génica (Sembdner y Parthier, 1993; Koda, 1992). Los mayores niveles de estos reguladores fueron informados en flores y tejidos reproductivos mientras que niveles más bajos fueron encontrados en raíces y hojas maduras (Farmer y Ryan, 1990).

Nuestros resultados indican que en follaje las concentraciones más altas se determinaron cuando la planta se encuentra en crecimiento. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Creelman y Mullet (1995) quienes señalan que los niveles de JA son más elevados en hojas que importan carbono y nitrógeno por lo tanto jóvenes,

que en aquellas totalmente expandidas. Durante las etapas posteriores de la ontogenia se comprobó una disminución de JA en follaje; por el contrario, raíces y estolones aumentan su contenido al inicio de la tuberización lo que sugiere que estos órganos aportan JA para desencadenar la tuberización.

La primera señal de tuberización en plantas de papa es la cesación del crecimiento del estolón. Subsecuentemente ocurre un ensanchamiento de la región subapical del mismo (Koda, 1997). Este ensanchamiento, en un estadio temprano de la tuberización, es debido a la expansión radial de las células en el tejido medular (Booth, 1963; Koda y Okasawa, 1983). Posteriormente el crecimiento vigoroso es causado por la expansión celular, por división celular y acumulación de almidón (Koda, 1997).

Takahashi et al. (1994) demostraron que JA y Me-JA inducen expansión de células de tubérculo de papa, además de tener una actividad disruptora de microtúbulos (Abe et al., 1990).

El primer incremento de JA que observamos en estolones podría constituir la señal que provoca desorganización de microtúbulos corticales (MTs) en la región subapical del estolón desencadenando el ensanchamiento del mismo.

La expansión de las células en la región subapical del estolón los cuales terminan tuberizando *in vitro*, es acompañada por una reorientación de los MTs (Fujino et al., 1995).

Todas las células en la región subapical de los tallos laterales elongados tienen los MTs orientados transversalmente. Cuando el crecimiento de los estolones cesa y comienza el ensanchamiento, la orientación de los MTs se vuelve longitudinal con respecto al eje del estolón (Koda, 1997). En la organización de los MTs estaría involucrada la fosforilación y desfosforilación de proteínas y Ca^{2+} /Calmodulin (Cyr y Palevitz, 1995). MacIntosh et al. (1996) demostraron la presencia en tallos y hojas de papa de una quinasa dependiente de calcio, CDPK, con mayor actividad específica al inicio de la estolonización y al ensanchamiento del estolón.

Posteriormente, un segundo aumento de JA observado al inicio de tuberización podría estar relacionado con la participación de este compuesto en el agrandamiento celular.

Koda et al. (1996) encontraron que la coronatina una fitotoxina producida por

Pseudomonas ssp., tiene actividad inductora de tuberización y de expansión celular. La coronatina está relacionada estructuralmente al conjugado de JA con isoleucina y se sugiere que JA tendría actividad después de su conversión a aminoácidos conjugados con JA (Krumm y Boland, 1996). Koda (1997) sintetizó varios conjugados de JA con aminoácidos y observó que la actividad de estos compuestos en la expansión celular era menor que JA por si solo, sugiriendo que los conjugados de aminoácidos no están involucrados en la tuberización de la planta de papa.

Nuestros resultados proveen un aporte más que descarta la participación de estos compuestos en la tuberización, debido a que no se encontraron conjugados de aminoácidos endógenos en ninguno de los órganos analizados durante las etapas de estolonización y tuberización.

A diferencia de lo que ocurre con los conjugados de JA con aminoácidos, Me-JA endógeno incrementa sostenidamente durante la conversión de estolón a tubérculo, por lo que no se descarta su participación en la expansión celular.

Si bien Koda (1997) afirma que la habilidad de expansión en respuesta a JA es específica de las células de la región subapical del estolón o tallos laterales y las células de los tubérculos fisiológicamente jóvenes, el descenso de los niveles de JA en yemas y brotes podría deberse a que JA estaría contribuyendo al crecimiento del tejido a través de la estimulación del agrandamiento celular. JA y Me-JA son capaces de inducir expansión celular en tejido parenquimático de papa a concentraciones por arriba de 10^{-5} M (Takahashi et al., 1994), por lo tanto no se descarta una acción similar a nivel de yemas, más aún, si se tienen en cuenta trabajos previos de Ravnkar y Gogola (1990) quienes informaron estimulación del desarrollo de tallos en meristemas aislados de papa. En tallos de vid y papa cultivados *in vitro* JA aumentó considerablemente la longitud del tallo (Ravnkar et al., 1990; 1992).

Koda (1997) sostiene que si JA presente en hojas no se metaboliza y se acumula se desencadenan reacciones de defensa en las que este compuesto está involucrado (Xu et al., 1994; Nojiri et al., 1992; Titarenko et al., 1997; Wasternack y Parthier, 1997). Por lo que JA sintetizado en hojas es metabolizado a TA o TAG y mediante estas formas solubles es transportado al resto de la planta (Koda, 1997). TA y TAG tienen un efecto inductor de la tuberización pero a diferencia de JA estos compuestos no inducen agrandamiento celular (Koda, 1997).

Koda, en su revisión de 1997, informa haber encontrado una concentración de $4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ en hojas de papa al inicio de tuberización y niveles bajos de JA en estolones y tubérculos desarrollados (resultados no publicados), de allí que el autor sostiene que este compuesto no actúa directamente *in situ* y que un precursor de JA, el 12-oxo-PDA, sería el compuesto responsable del inicio de la tuberización. El 12-oxo-PDA parece poseer ambas propiedades: inducir tuberización y agrandamiento celular. En nuestro trabajo hemos medido concentraciones mucho más elevadas, que se aproximan a los $130.8 \text{ ng} \times \text{g}^{-1}$ de PS en follaje y $180.4 \text{ ng} \times \text{g}^{-1}$ en estolones al inicio de la tuberización, por lo que JA tendría un papel específico en el inicio de la tuberización debido a que se encuentra en concentraciones inductoras.

Yoshihara et al. (1996a) examinaron el metabolismo de ^{14}C -JA y observaron que se metabolizaba a TAG independientemente del fotoperíodo al que fueran expuestas las plantas, pero la acumulación de material radioactivo en estolón fue mayor bajo condiciones de día corto (Yoshihara et al., 1996b) lo que sugiere que el fotoperíodo afecta el transporte de TAG.

La señal para tuberización es TA y TAG formados en hojas y otros órganos como raíces, que se trasladan a estolones causando un incremento de JA. Por lo que concluimos que el JA *per se* es la molécula señal que induce tuberización *in situ* y que no es una sola señal sino dos, la primera de ellas estimula la reorientación de los microtúbulos corticales y la segunda expansión celular.

Pero como se mencionó en un principio un evento morfogénico tan complejo como la tuberización no está regulado por una sola fitohormona.

Hasta el momento la bibliografía existente señala sólo una disminución de GAs durante la fase de tuberización sin establecer la identidad química de ellas ni precisar cuantificaciones por métodos físico-químicos exactos (Vreugdenhil y Struik, 1989). En este trabajo identificamos las giberelinas presentes GA_3 , GA_1 y en menor proporción GA_8 . Además, pudimos aislar nuevas giberelinas tipo di-hidro-tri-hidroxi C_{19} (por lo menos tres) las cuales no han sido aún clasificadas.

La identificación de GA_3 , GA_1 y GA_8 en follaje señala que en esta especie operaría la vía de síntesis 13-hidroxilativa.

Los resultados indican que GA_3 está presente en alta concentración en los brotes y que su nivel disminuye en follaje en pleno crecimiento, para luego

incrementarse en las raíces. Mientras que las concentraciones de GA₁ siguen una cinética inversa, aunque sus niveles son muy inferiores a los de GA₃.

En brotes la presencia de GA₃ y GA₁ indicaría su acción en el crecimiento de estos órganos. Posteriormente en la etapa de pleno crecimiento del follaje la mayor concentración de GA₁ podría confirmar su función en este proceso, hecho comprobado para otras especies (Phinney, 1985; MacMillan, 1988).

Por otro lado las giberelinas disminuyen en estolones durante esta etapa estableciéndose un balance endógeno entre ellas y JA.

Este balance endógeno observado en estolones ocurre también en el resto de los órganos y en las distintas etapas de la ontogenia. Es así como durante el crecimiento los altos niveles endógenos de GA₃ en raíces podrían estar inhibiendo el proceso de tuberización temprana que de otra manera sería iniciado por la alta concentración de JA en estos órganos.

Estos estudios proveen información acerca de los niveles endógenos de JA y GAs en diferentes órganos de la planta de papa durante su ciclo ontogénico, brindando un aporte más a la comprensión del complejo proceso de la tuberización.

CAPITULO II

APLICACIONES EXOGENAS

MICROGOTA FOLIAR: NUEVA TECNICA *IN VITRO* PARA LA APLICACION DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO

INTRODUCCION

La identificación y caracterización de la función de las hormonas en la regulación del crecimiento vegetal ha estado ligada a estudios del desarrollo *in vitro*. Los métodos utilizados para la formación de tubérculos *in vitro* se diferencian en las características y el tiempo necesario para la inducción de los mismos (Tovar et al., 1985).

Para la producción en masa de microtubérculos de papa es necesario conocer como manipular las plántulas para obtener numerosos tubérculos en un corto período (Marinus, 1990).

El cultivo *in vitro* de tubérculos de papa es una importante técnica tanto para la investigación aplicada como para la básica (Vreugdenhil et al., 1994). Este puede ser usado para la conservación de germoplasma (Wang y Hu, 1985) y la producción de papas semillas (Hussey y Stacey, 1981), pero también en el estudio de los eventos morfogénicos tempranos durante la formación de tubérculos (Peterson y Barker, 1979) o la regulación de la expresión génica asociada con la inducción de la tuberización (Hannapel, 1991; Hendricks et al., 1991).

Barker (1953) demostró que la aislación de nudos de tallos etiolados de papa podían crecer en cultivo aséptico. Este autor obtuvo tumores de raíces y estolones, algunos de los cuales dieron tubérculos. Otros han utilizado esta técnica para el cultivo de piezas nodales aisladas (Gregory, 1956; Chapman, 1958; Peterson y Barker, 1979), y cultivos de estolones o segmentos aislados de tallo se han empleado en estudios del efecto de las hormonas sobre la tuberización (Palmer y Smith, 1969; 1970; Smith y Palmer, 1970; Garcia-Torres y Gomez-Campo, 1973; Palmer y Barker, 1973).

Peterson y Barker (1979) demostraron que los mini-tubérculos obtenidos *in vitro* eran básicamente iguales a los obtenidos en cultivo a campo.

El término "micropropagación" fue originalmente definido como un procedimiento de cultivo aséptico que involucra la manipulación de órganos, tejidos o células que producen una población de plántulas evitando el proceso sexual normal o la propagación vegetativa no aséptica (Zimmerman y Debergh, 1990). En la práctica ápices de tallos y yemas laterales son los puntos más comunes de partida en la obtención de plantas (Zimmerman y Debergh, 1990).

Tres estadios se han designado para ordenar la secuencia de eventos asociados a la micropropagación: I - estadio de estabilización, II - multiplicación de tallo, III - enraizamiento, y un cuarto estadio debe ser tenido en cuenta: la transferencia final al medio ambiente (Zimmerman y Debergh, 1990).

Familiarizarse con la morfología de cualquier planta es el primer requisito para la manipulación de los propágulos *in vitro*. El medio específico y las condiciones de cultivo debe ser adecuado a estos estadios para una especie determinada (Zimmerman y Debergh, 1990).

Este sistema de microplantas provee un modelo de experimentación para el estudio de la tuberización uniforme y conveniente (Lopez-Delgado y Scott, 1997). El control hormonal de la tuberización de papa es un proceso complejo de desarrollo y existen diferentes métodos para alterar el balance hormonal e inducir tuberización (Tovar et al., 1985). Uno de los métodos más utilizados para la inducción de microtubérculos es el cultivo de microplantas en un medio conteniendo citocininas y un retardante del crecimiento que inhibe la biosíntesis de giberelinas (Estrada et al., 1986; Harvey et al., 1991; Levy et al., 1993; Simko, 1993; Jackson y Wiltmitzer, 1994; Pelacho et al., 1994). En algunos casos se utiliza auxinas (Mangat et al., 1984).

Es conocido que JA a bajas concentraciones (10^{-6} μ M) promueve el crecimiento de plántulas *in vitro* (Koda, 1997). El diseño de nuevas técnicas que permitan un mejor estudio y la aplicación de JA en cultivo *in vitro* donde la morfogénesis puede ser reproducida nos permitirá conocer la acción de esta fitohormona sobre la tuberización de *Solanum tuberosum*.

OBJETIVOS

1. Desarrollar un método de producción *in vitro* de tubérculos con un corto período de inducción (obtención de numerosos tubérculos en el menor tiempo posible).
2. Estudiar la acción del JA incorporado al medio de cultivo o aplicado por vía foliar sobre la tuberización de estacas uninodales de papa cultivadas *in vitro*.
3. Determinar las concentraciones óptimas de JA que promueven tuberización.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Para los bioensayos que a continuación se describen se utilizaron estacas uninodales de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Spunta) cultivadas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con la adición de sacarosa al 3%, crecidas a luz continua y a 25°C durante 28 días.

Bioensayo A: JA incorporado al medio de cultivo

El JA incorporado en diferentes concentraciones al medio de tuberización agarificado con macronutrientes White (White, 1943) + micronutrientes Nitsch (Nitsch, 1951) + complejo vitamínico Morel (Morel, 1948) + sacarosa al 8% fue ajustado a pH 5.8 y esterilizado en autoclave a 0.5 atm durante 30 min.

Estacas uninodales de papa fueron plantadas, bajo cámara de flujo laminar, en tubos de cultivo conteniendo el medio estéril. Cada experimento se llevó a cabo con una muestra de 10 explantos por tratamiento. Las concentraciones

usadas fueron las siguientes:

JA	$0.5 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \text{ml}$
JA	$1 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \text{ml}$
JA	$5 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \text{ml}$
JA	$10 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \text{ml}$
JA	$15 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \text{ml}$

Las estacas se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones de oscuridad continua y a 18 - 20°C. El porcentaje de tuberización, desarrollo de raíces y estolones se registró cada 7 días durante los 50 días que duró el experimento. Al final de la experiencia se midió PS y PF de raíces, estolones y tubérculos.

Bioensayo B: JA aplicado por vía foliar

El medio de tuberización White-Nitsch-Morel + sacarosa al 8% fue ajustado a pH 5.8 y esterilizado en autoclave a 0.5 atm durante 30 min.

Las estacas uninodales de papa se plantaron en tubos de cultivo (una estaca por tubo) bajo cámara de flujo laminar. Posteriormente, sobre la yema axilar y lámina foliar de la estaca fue aplicada una microgota (50 μl) correspondiente a las concentraciones de JA previamente mencionadas para el bioensayo A.

Las estacas se mantuvieron a oscuridad continua y 18 - 20°C durante 50 días. Semanalmente se evaluó porcentaje de tuberización, desarrollo del sistema radical y de estolones; así como también PF y PS de raíces, estolones y tubérculos.

RESULTADOS

Los resultados muestran claramente que JA aplicado por vía foliar mediante

microgota produce un mayor porcentaje de tuberización que cuando es incorporado al medio de cultivo.

Con la incorporación de JA al medio de cultivo se obtuvo 40% de tuberización con una concentración de $5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ de JA, luego de 50 días de iniciado el tratamiento (Fig. 1). Mientras que la aplicación de JA mediante microgota resultó ser más efectiva en cuanto a porcentaje de tuberización, ya que al cabo de 50 días el 70% de las estacas tuberizaron al ser tratadas con una concentración de JA de $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ (Fig. 1).

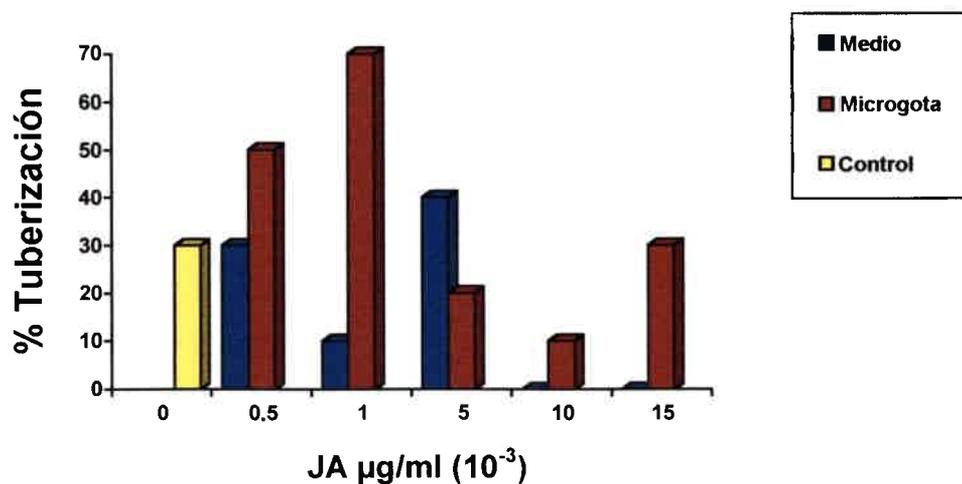


Fig. 1. Porcentaje de tuberización obtenido con JA incorporado al medio de cultivo o aplicado mediante microgota vía foliar. Control: sin JA. Ordenada: % de tuberización luego de 50 días de iniciado el cultivo *in vitro* de las estacas de papa. Abscisa: concentraciones de JA en $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-3}$.

A los siete días de aplicada la microgota el 10 % de las plántulas tuberizan cualquiera sea la concentración de JA utilizada mientras que cuando JA se incorpora al medio sólo el 10 % de las plántulas tratadas con $5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ de JA tuberizan, y lo hacen recién a los 35 días de cultivo.

Las concentraciones más efectivas de este compuesto (JA) para inducir tuberización fueron $0.5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ y $1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$, aunque el mayor PF de tubérculos se obtuvo cuando una concentración de $15 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ fue aplicada

por microgota vía foliar (Fig. 2).

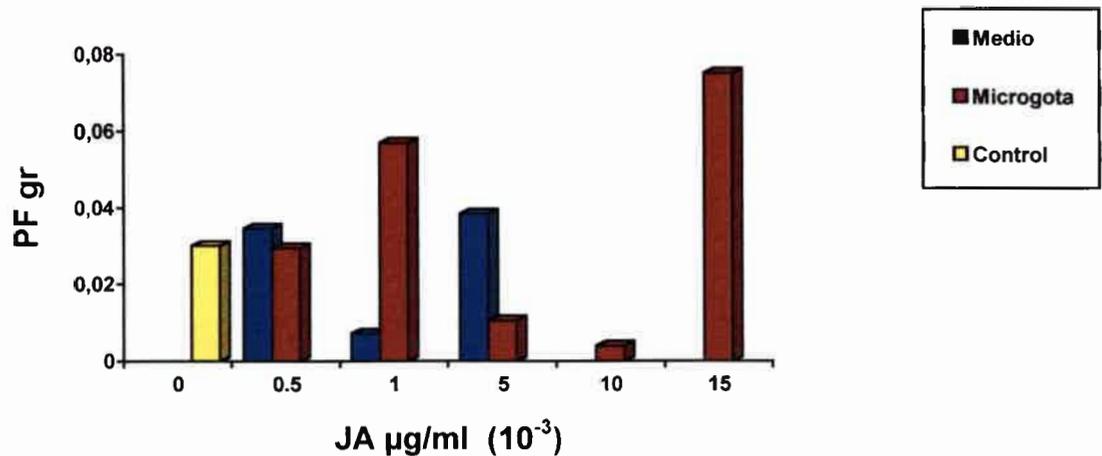


Fig. 2. Peso fresco de tubérculos producidos por las estacas cultivadas *in vitro* con JA incorporado al medio o aplicado mediante microgota por vía foliar. Ordenada: PF de tubérculos a los 50 días de iniciado el cultivo. Abscisa: concentraciones de JA en $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-3}$.

DISCUSION

En este trabajo se propone un bioensayo diferente, basado en la aplicación de una microgota en la yema axilar y lámina foliar de estacas uninodales. Con este método la respuesta obtenida, medida como porcentaje de tuberización, fue más inmediata en el tiempo que cuando el regulador se aplica vía radical. La aplicación de la microgota tiene la ventaja de una rápida respuesta de la planta a JA, además de una mayor efectividad traducida en porcentaje de tuberización.

Muchos programas de producción y mejoramiento de papa están utilizando tubérculos *in vitro* para sus trabajos de multiplicación de semilla (Tovar et al., 1985). Los tubérculos *in vitro* pueden ser utilizados como material inicial una vez superadas las pruebas de patógenos en un programa de multiplicación de semilla y pueden ofrecer algunas ventajas sobre la plántula *in vitro*. Estos tubérculos

pueden ser sembrados en macetas en invernadero, para producir plantas madres libres de patógenos a partir de las cuales se obtienen esquejes como parte de un programa de multiplicación rápida (Tovar et al., 1985).

La aplicación de JA mediante la técnica de microgota foliar es una técnica sencilla y económica, ya que se requiere menor concentración de hormona para inducir tuberización que la requerida si se incorpora en el medio de cultivo. Además de la producción de numerosos tubérculos en un corto tiempo se obtienen tubérculos de mayor tamaño.

El rendimiento de los tubérculos semillas obtenidos de los tubérculos *in vitro* es mayor cuanto mayor sea el peso de estos últimos.

Por todas estas ventajas sería recomendable el uso de jasmonatos aplicados por microgota foliar en los programas de papa semilla, así también como para la investigación básica a fin de evaluar la acción de JA en la morfogénesis de plantas.

EFFECTO DEL FOTOPERIODO Y FITOHORMONAS SOBRE LA MORFOGENESIS DE MICROPLANTAS DE PAPA *IN VITRO*

INTRODUCCION

El crecimiento y desarrollo en plantas superiores, son gobernados por una compleja interacción entre señales ambientales y programas endógenos de desarrollo. Estos programas de desarrollo incluyen la acción de diferentes fitohormonas pero la interacción de la señal lumínica con la señal hormonal no es aún clara (Chory y Li, 1997).

La formación de tubérculos de papa es dependientemente del cultivar y responde a días cortos; además existe una interacción entre luz y temperatura (Ewing, 1995; Vreugdenhil y Struik, 1989). Makronosov y Lundina (1959) demostraron que una interrupción de 20 minutos en la mitad del período de oscuridad de 14 hs inhibe la formación de tubérculos en *Solanum tuberosum* L. cv Larch y Demisun.

La participación del fitocromo en esta respuesta fue confirmada mostrando reversibilidad del efecto inhibitor de la interrupción del período oscuro con luz roja por subsecuentes irradiaciones de rojo lejano (Batutis y Ewing, 1982).

El fotoperíodo afecta ciertos pasos en la biosíntesis de GAs en varias especies, e. g. espinaca, arveja y sauce (Davies et al., 1986; Gilmour et al., 1986; Olsen et al., 1993) y el fitocromo B afecta los niveles de GAs o la sensibilidad de los tejidos a la hormona (Devlin et al., 1992, Foster et al., 1994, Weller et al., 1994; Lopez-Juez et al., 1995). Días cortos resultan en una disminución de GAs y en una reducción de la elongación del estolón (Railton y Wareing, 1973); aplicación de GAs detienen la formación del tubérculo (Vreugdenhil y Helder, 1991). GA₃ y otras giberelinas como A₁, A₄, A₅, A₇ y A₉ retardan o inhiben tuberización en planta entera (Okasawa, 1967; Tizio, 1964a; 1979), en estacas (Tizio, 1969; 1971), estolones cultivados in vitro (Koda y Okasawa, 1983a), y secciones de tallos

(Guiñazú et al., 1988; Tizio, 1979). Pero este fenómeno es revertido por inhibidores de la síntesis de GAs como CCC (Guiñazú et al., 1988; Abdala et al., 1995). Recientemente, estudios *in vitro* se demostró un efecto positivo de paclobutrazol en el crecimiento de tubérculos (Simko, 1993). Esta antigiberelina es efectiva en la tuberización *in vitro* de papa a muy bajas concentraciones (Harvey et al., 1991; Simko, 1991). Diferentes inhibidores de GA han sido usados para inducir otros eventos morfogénicos como la floración, tal es el caso de la aplicación de uniconazol un inhibidor triazol de la biosíntesis de GA en *R. sativus* (Nishijima et al., 1997).

La formación de tubérculos puede ser explicitada por la aplicación exógena de JA, Me-JA y ácido cucúrbico (Yoshihara et al., 1989; Koda et al., 1991; Nojiri et al., 1992). Concentraciones de 0.1-1 μM de JA agregadas al medio de cultivo incrementan significativamente la longitud de las plantas desarrolladas y da como resultado un sistema radical bien diferenciado y con muchas raíces adventicias (Ravnikar et al., 1992).

Pelacho y Mingo-Castel (1991) probaron la acción de JA sobre el desarrollo de estolones de *Solanum tuberosum* L. cultivados *in vitro* y demostraron que este compuesto se comporta como un fuerte acelerador de la tuberización, asociando este efecto a la ausencia de sistema radical. Además demostraron que la tuberización disminuye cuando se incrementa la longitud del fotoperíodo. Koda (1997) observó que no sólo JA o sus derivados como TA, TAG y Me-JA inducen tuberización sino que también 12-oxo-PDA un precursor de la biosíntesis tiene actividad inductora en la formación de tubérculos.

El nivel de JA estaría regulado por el fotoperíodo; puesto que la actividad de la lipoxigenasa está controlada por el fitocromo en plántulas de algunas especies (Surrey, 1967), el fotoperíodo podría afectar los niveles de JA o compuestos relacionados vía cambios de la actividad de lipoxigenasa o enzimas relacionadas (Koda y Kikuta, 1991).

Las lipoxigenasas se caracterizan por ser inhibidas por ácido salicílico (Park y Polacco, 1989); también la expresión génica de proteínas de almacenamiento inducidas por "wounding", puede ser efectivamente inhibida por

50 μM de SHAM (Helder et al., 1993).

El sistema de microplantas *in vitro* provee un modelo experimental para estudiar la interacción de las fitohormonas involucradas en la tuberización (jasmonatos y giberelinas) y el fotoperíodo (DC, OC y DL).

Mediante la técnica de la microgota se estudió el efecto de las fitohormonas, utilizando inhibidores y precursores de las mismas bajo diferentes condiciones fotoperiódicas.

OBJETIVO

Analizar el efecto del fotoperíodo y las fitohormonas sobre la morfogénesis, especialmente la formación de tubérculos en plantas de papa *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Estacas uninodales de papa de 28 días cultivadas *in vitro* en medio Murashige-Skoog fueron subcultivadas en medio de tuberización agarificado con macronutrientes White (White, 1943), micronutrientes Nitsch (Nitsch, 1951) y complejo vitamínico Morel (Morel, 1948) con la adición de 8 % de sacarosa.

Tuberización *in vitro*

Se realizaron experiencias por duplicado bajo condiciones fotoperiódicas de oscuridad continua (OC), día largo (DL) y bajo condiciones fotoperiódicas de día corto (DC). La intensidad lumínica fue de $80 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y la temperatura ($18\text{-}20^\circ\text{C}$).

Una microgota de 50 μl (Abdala et al., 1996) de diferentes concentraciones de PGRs se aplicaron sobre la lámina foliar y yema axilar de la estaca de papa cultivada *in vitro*.

Las concentraciones de reguladores utilizadas fueron las siguientes:

Control	Agua
Acido jasmónico	1 μ M
SHAM	25 μ M
GA₃	100 μ M y 1000 μ M
Uniconazol	0.02 μ M
Acido linolénico	0.01 μ M y 1 μ M

Se tomaron mediciones semanales del crecimiento de raíces, estolones y tubérculos. Cuando el tratamiento control alcanzó el 40% de las estacas tuberizadas se midió el porcentaje de tuberización en los restantes tratamientos y se evaluó peso seco. También se registró el peso fresco de los diferentes tejidos, y la longitud de raíces y estolones.

Diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo con 24 replicaciones por tratamiento y dos repeticiones por experimento. Los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de ANOVA y test de LSD-Fisher.

RESULTADOS

A- Ensayo a oscuridad continua

En condiciones fotoperiódicas de oscuridad continua la aplicación de SHAM 25 μ M afectó la formación de tubérculos en estacas cultivadas *in vitro*, observándose una disminución del porcentaje de tuberización respecto al control y al tratamiento con JA (Fig. 1). De la misma manera el PF de los tubérculos disminuyó con la aplicación de este regulador (Figs. 2 y 7A).

Uniconazol inhibió la formación de estolones y de tubérculos. La aplicación de este regulador condujo a la formación de tallos aéreos con hojas etioladas, esta última característica debido a que la experiencia se desarrolló en ausencia de luz o

a una inhibición completa del crecimiento con una concentración de 0.02 μM (Figs. 1 y 7A).

La aplicación de ácido linolénico (LA), a una concentración de 1 μM , estimuló el desarrollo de tubérculos. Mientras que concentraciones inferiores inhibieron tuberización (Fig. 1). Si bien LA promovió tuberización el peso fresco de los tubérculos fue menor a los obtenidos con JA (Figs. 2 y 7A).

La eficacia de JA fue puesta de manifiesto por la obtención de más de un tubérculo por estaca; alcanzándose a los 55 días el porcentaje máximo de tuberización con una concentración de JA de 1 μM . Además de obtenerse un mayor número de tubérculos con la aplicación de este regulador, los mismos tuvieron un peso fresco promedio considerablemente mayor que los obtenidos con el resto de los tratamientos (Figs. 1 y 2).

Si bien con una concentración de GA_3 (100 μM) se obtuvieron porcentajes medios de tuberización, los tubérculos desarrollados por las estacas tratadas fueron muy pequeños (Figs. 1 y 2).

B- Ensayo bajo condiciones de día corto

En condiciones fotoperiódicas de DC el mayor porcentaje de tuberización se obtuvo con JA y LA (Fig. 3), aunque la respuesta a LA fue más inmediata alcanzando un 50% de estacas tuberizadas a los 40 días de iniciado el ensayo. El PF de los tubérculos obtenidos por la aplicación de JA fue menor que los obtenidos en oscuridad (Tabla 1 y Fig. 4).

De la misma manera, el Uniconazol (0.02 μM) explicitó tuberización en un 50% de las estacas uninodales; al igual que GA_3 y control (Fig. 3).

C- Ensayo bajo condiciones de día largo

En condiciones fotoperiódicas de DL la formación de tubérculos tuvo lugar a los 43 días de iniciado el ensayo.

Las estacas tratadas con JA 1 μM alcanzaron un 100% de tuberización a los 90 días de iniciado el cultivo. La aplicación de GA_3 100 μM condujo a un 70% de estacas tuberizadas, concentraciones superiores disminuyeron el porcentaje de

tuberización (Fig. 5).

El porcentaje de estacas tuberizadas en condiciones de DL disminuyó con respecto a las estacas tratadas con LA en condiciones de DC, concentraciones de 0.01 μM alcanzaron un 60% de tuberización (Fig. 5).

A diferencia de lo ocurrido en DC, en condiciones de DL el SHAM en concentraciones 25 μM no inhibió la formación de tubérculos, en cambio si fue inhibido con la aplicación de uniconazol (Fig. 5).

Al igual que en DC y oscuridad continua el mayor peso fresco de tubérculos se obtuvo con la aplicación de JA 1 μM (Figs. 6 y Tabla 1).

Tabla 1. Influencia de los diferentes reguladores sobre el porcentaje de tuberización y peso fresco de tubérculos de estacas uninodales de papa bajo condiciones de oscuridad continua (OC), día largo (DL) y día corto (DC).

		OC		DL		DC	
		% tuberización	PF de tubérculo	% tuberización	PF de tubérculo	% tuberización	PF de tubérculo
Control	-----	28	0.026	28	0.023	50	0.008
JA	1 μM	112	0.102	94	0.141	90	0.023
LA	0.01 μM	44	0.057	65	0.037	90	0.014
SHAM	25 μM	35	0.005	53	0.033	40	0.008
GA ₃	100 μM	61	0.039	83	0.064	50	0.007
UNZ	0.02 μM	48	0.029	29	0.059	50	0.010

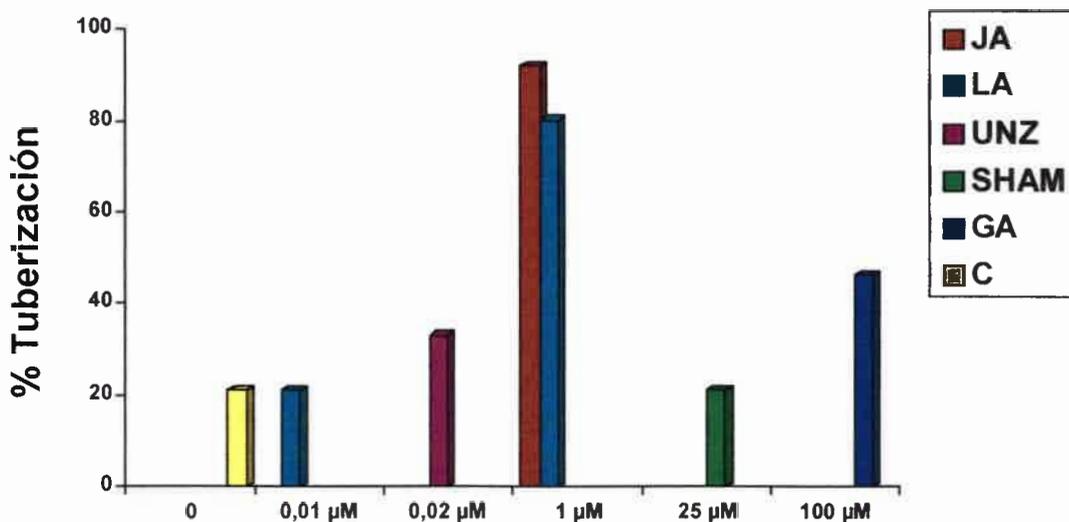


Fig. 1. Porcentaje de tuberización en respuesta a la aplicación por microgota foliar de diferentes reguladores del crecimiento bajo condiciones fotoperiódicas de oscuridad continua. Ordenada: % de tuberización a los 50 días de iniciado el cultivo *in vitro* de las estacas de papa. Abscisa: concentración de reguladores del crecimiento en μM .

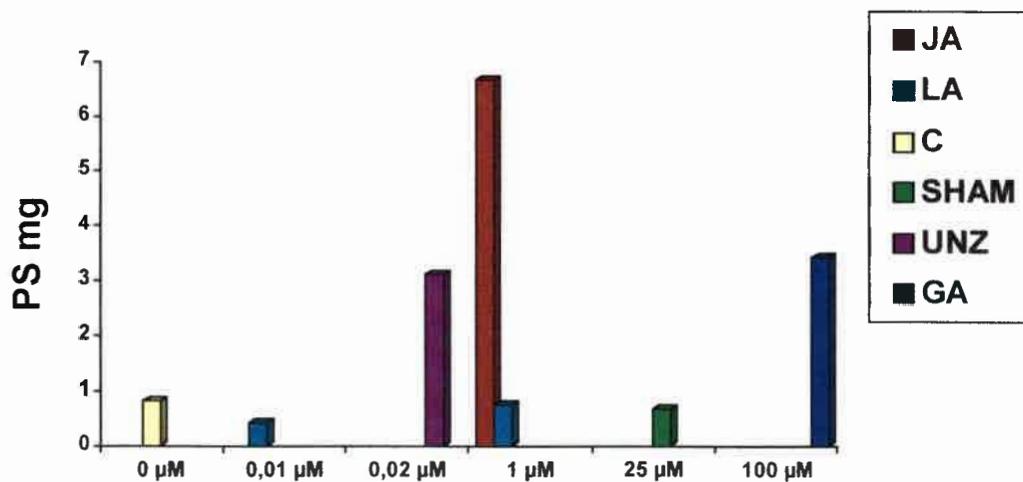


Fig. 2. Peso seco de tubérculos producidos por las estacas de papa cultivadas *in vitro* a oscuridad continua a los 50 días de iniciado el experimento, tratadas con los distintos reguladores del crecimiento aplicados por microgota foliar. Ordenada: peso fresco de tubérculos expresados en mg. Abscisa: concentración de reguladores del crecimiento en μM .

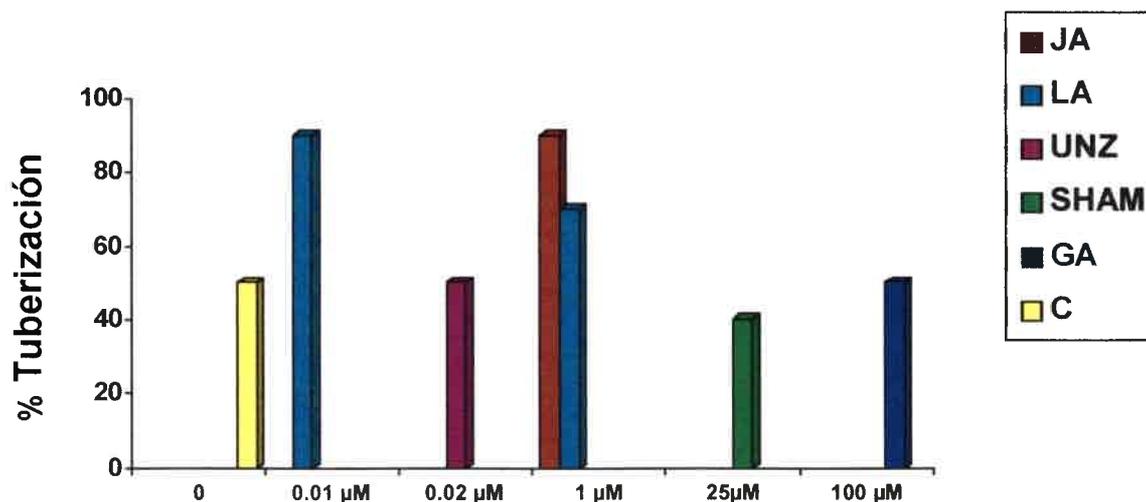


Fig. 3. Porcentaje de tuberización en respuesta a la aplicación por microgota foliar de diferentes reguladores del crecimiento bajo condiciones fotoperiódicas de DC. Ordenada: % de tuberización a los 60 días de iniciado el cultivo *in vitro* de las estacas de papa. Abscisa: concentración de reguladores del crecimiento en μM .

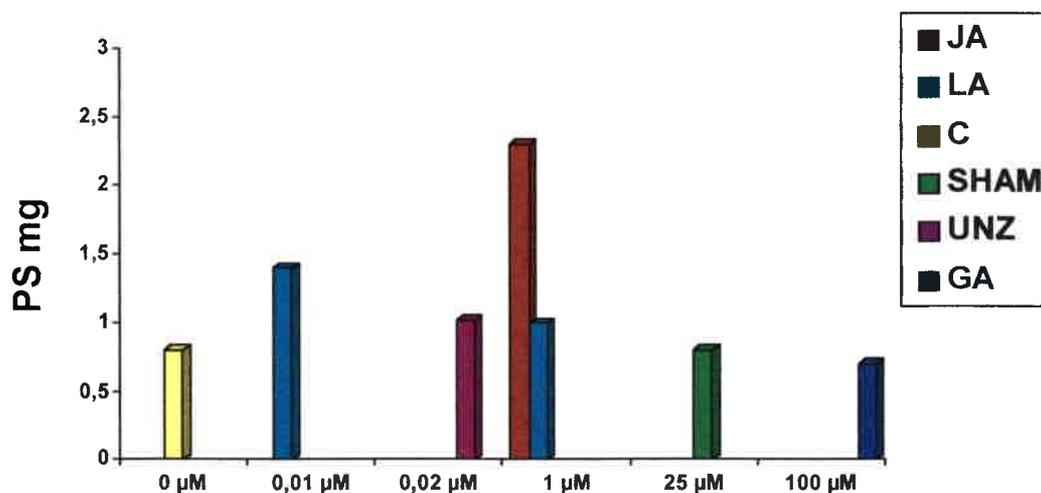


Fig. 4. Peso seco de tubérculos producidos por las estacas de papa cultivadas *in vitro* bajo condiciones fotoperiódicas de DC a los 60 días de iniciado el experimento, tratadas con diferentes reguladores del crecimiento aplicados por medio de microgota foliar. Ordenada: peso fresco de tubérculos expresados en mg. Abscisa: concentración de reguladores del crecimiento en μM .

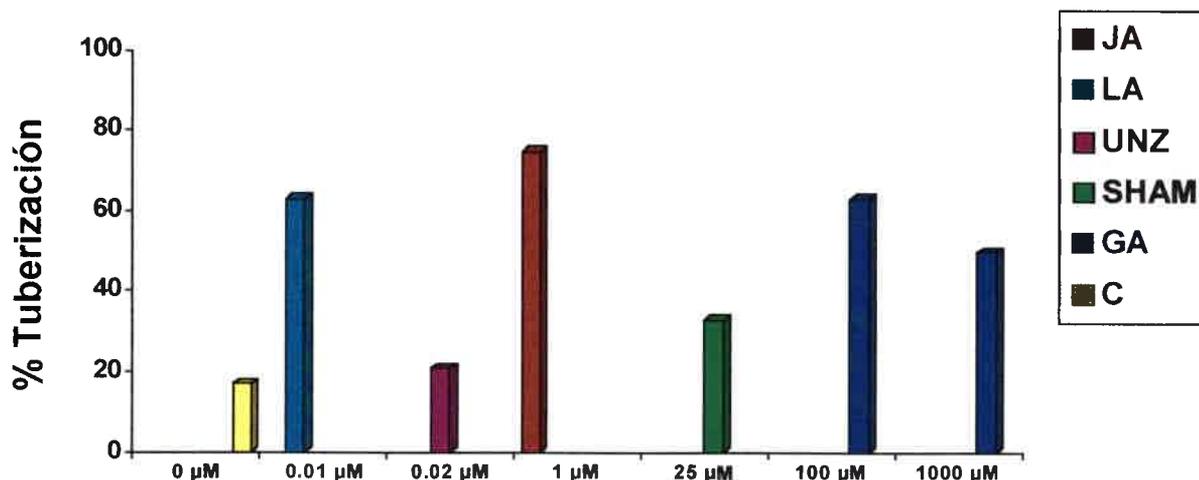


Fig. 5. Porcentaje de tuberización en respuesta a la aplicación por microgota foliar de diferentes reguladores del crecimiento bajo condiciones fotoperiódicas de DL. Ordenada: % de tuberización a los 90 días de iniciado el cultivo *in vitro* de las estacas de papa. Abscisa: concentración de reguladores del crecimiento aplicados en μM.

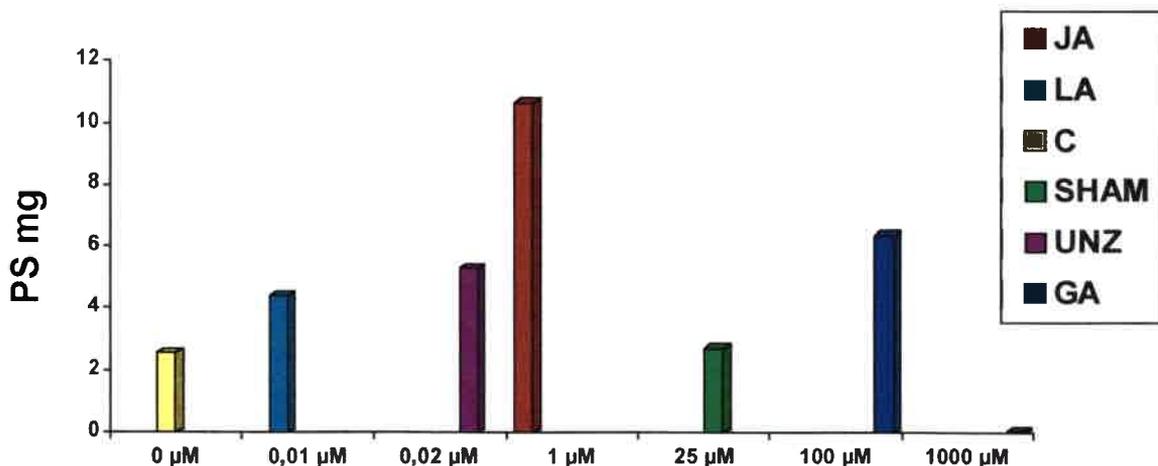


Fig. 6. Peso seco de tubérculos producidos por las estacas de papa cultivadas *in vitro* bajo condiciones fotoperiódicas de DL a los 90 días de iniciado el experimento, tratadas con JA y LA aplicados por medio de microgota foliar. Ordenada: peso fresco de tubérculos expresados en gramos. Abscisa: concentraciones de JA y LA en μM.

Las características exo-morfológicas de las microplantas se vieron afectadas por la aplicación de los diferentes reguladores del crecimiento. Con el tratamiento de JA se obtuvieron plantas más vigorosas (Fig. 7). Se observó que el sistema radical de estacas tratadas con JA mostraron un mayor grosor que en el resto de los tratamientos independientemente de las condiciones fotoperiódicas en que se realizaron las experiencias (Fig. 7); aunque la longitud de las raíces tratadas con JA fue mayor en condiciones fotoperiódicas de DC (Tabla 2 y 3).

Las raíces producidas por las estacas tratadas con GA₃ fueron escasas y finas. La aplicación de SHAM condujo a la formación de un sistema radical escaso y de poca longitud; esto mismo fue observado con LA. Las estacas tratadas con UNZ desarrollaron raíces muy finas y (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Longitud y peso fresco de raíces y estolones de estacas uninodales controles y tratadas con JA, GA₃, LA, UNZ, SHAM en condiciones fotoperiódicas de DC.

		RAICES		ESTOLONES	
		Longitud en cm	PS en g	Longitud en cm	PS en g
Control	0	1.5	0.015	10.0	0.15
LA	0.01 µM	1.5	0.084	12.6	0.21
UNZ	0.02 µM	3.0	0.048	12.5	0.36
GA ₃	100 µM	1.8	0.063	14.2	0.21
SHAM	25 µM	1.5	0.024	5.5	0.15
JA	1 µM	3.0	0.574	13.4	0.98

Tabla 3. Longitud y peso fresco de raíces y estolones de estacas uninodales controles y tratadas con JA, GA₃, LA, UNZ, SHAM en condiciones fotoperiódicas de DL.

		RAICES		ESTOLONES	
		Longitud en cm	PS en g	Longitud en cm	PS en g
Control	0	2.20	0.156	3.85	0.28
LA	0.01 µM	1.92	0.041	4.82	0.32
UNZ	0.02 µM	2.63	0.070	5.76	0.60
GA ₃	100 µM	1.69	0.084	5.07	0.46
SHAM	25 µM	1.02	0.034	4.70	0.36
JA	1 µM	2.16	0.662	4.03	0.55

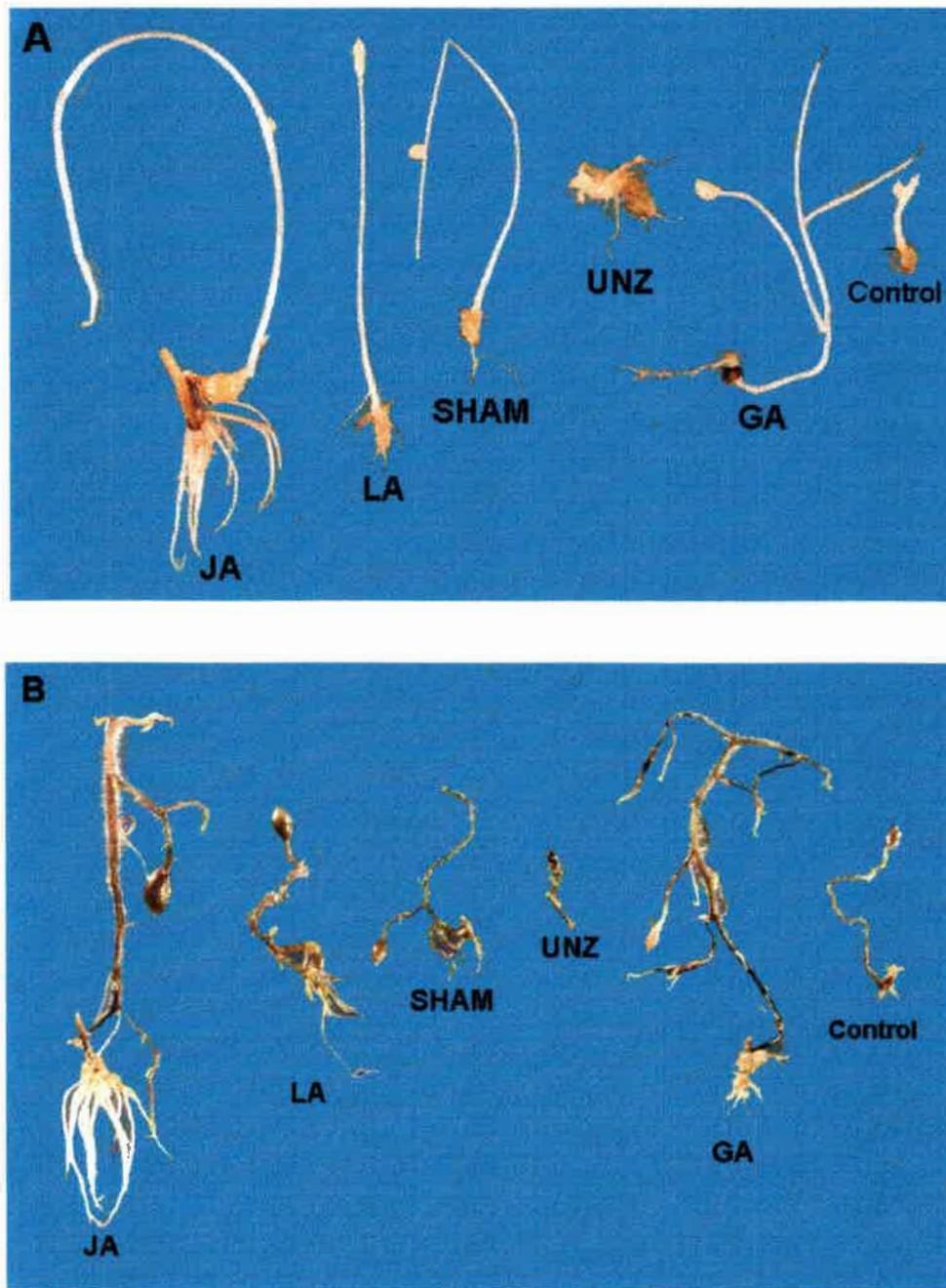


Fig. 7. Efecto de los reguladores del crecimiento y condiciones fotoperiódicas en la morfología de las plantas. **A**, bajo oscuridad continua; **B**, bajo día largo.

significativa ($p < 0.00021$).

Ensayo bajo condiciones de día largo y oscuridad continua

Las siguientes Tablas resumen la estadística descriptiva para el parámetro de PS de tubérculos bajo dos condiciones experimentales: oscuridad continua (Tabla 5) y día largo (Tabla 6).

Tabla 5. Estadística descriptiva para el peso seco de tubérculos bajo distintos tratamientos en oscuridad continua.

Variable	n	Media	E.S.	D.S.	Mínimo	Máximo	Mediana
JA	22	6.67	0.39	1.85	3.53	11.00	6.86
LA	5	0.41	0.08	0.18	0.25	0.70	0.38
SHAM	5	0.67	0.10	0.22	0.44	0.98	0.58
UNZ	8	3.11	0.98	2.77	0.51	8.85	2.23
GA ₃	11	3.42	0.89	2.95	0.51	10.60	2.58
Control	5	0.80	0.35	0.77	0.30	2.16	0.50

Tabla 6. Estadística descriptiva para el peso seco de tubérculos bajo distintos tratamientos en día largo.

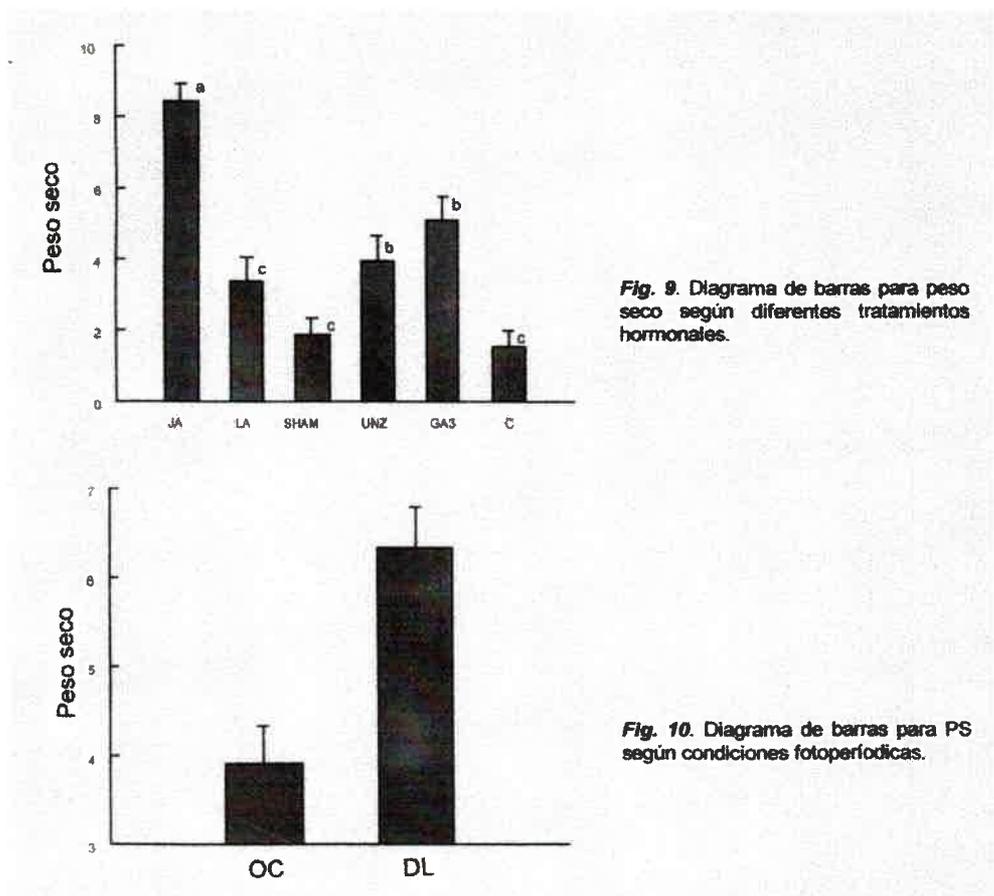
Variable	n	Media	E.S.	D.S.	Mínimo	Máximo	Mediana
JA	18	10.65	0.56	2.39	4.65	15.80	10.52
LA	15	4.41	0.65	2.51	1.66	10.92	3.54
SHAM	8	2.69	0.57	1.60	0.82	6.30	2.40
UNZ	5	5.28	0.83	1.85	2.04	6.57	6.00
GA ₃	15	6.36	0.82	3.19	0.79	11.49	6.65
Control	4	2.55	0.64	1.28	1.23	4.16	2.40

El análisis de la varianza aplicado a la comparación de los valores medios de un experimento factorial con un factor: tratamiento hormonal y el otro condiciones fotoperiódicas, produjo el siguiente cuadro de análisis de la varianza. Estos resultados indican la existencia de efectos principales: para tratamientos hormonales ($p < 0.0001$) y condiciones fotoperiódicas ($p < 0.0001$), pero para la interacción entre ambos ($p = 0.557$).

La Fig. 9 presenta los diagramas de barra por tratamiento hormonal. Letras diferentes indican diferencias significativas (según test LSD-Fisher). Existen 3 grupos de tratamientos, JA por un lado con los mayores pesos secos, UNZ y GA₃ con peso secos intermedios y el control junto a LA y SHAM con los menores

niveles de peso seco.

La Fig. 10 presenta los diagramas de barra para las condiciones fotoperiódicas. Es perfectamente claro que las plantas expuestas a condiciones de día largo, generan tubérculos de mayor peso seco.



DISCUSION

Los efectos morfogénicos de la luz (calidad, intensidad y duración) y de las fitohormonas han sido bien documentados (Voskresenkaya, 1979; Vince-Prue, 1985; Pharis y Reid, 1985) pero el modo de acción y la interacción mutua no ha sido aclarado.

Los resultados de este estudio confirman que JA tiene un efecto promotor tanto sobre la tuberización como sobre el PS de *Solanum tuberosum* L cv. Spunta en cualquiera de las condiciones ensayadas. El efecto inductor de JA y Me-JA fue demostrado en estudios previos usando segmentos uninodales del cv. Irish Cobbler (Koda et al., 1991) y estolones del cv. Kennebec (Pelacho y Mingo-Castel, 1991) cultivados en oscuridad continua. Helder et al. (1993) reportaron que el fotoperíodo afecta la hidroxilación de JA. Bajo DC tanto 11-OH-JA y 12-OH-JA (TA) fueron encontrados en hojas de *S. demissum* y se formaron tubérculos; bajo DL no hubo tuberización y estos compuestos no se detectaron.

A menudo existe una considerable variabilidad genotípica en la tuberización en respuesta a PGRs (Levy et al., 1993; Simko, 1993).

Jackson y Willmitzer (1994) sostienen que JA no está directamente involucrado en la tuberización debido a que su aplicación no indujo tuberización en *Solanum andigena* y *Solanum demissum* bajo condiciones de DL.

Los autores confirmaron la incorporación de JA aplicado midiendo los niveles de transcriptos de un inhibidor de proteasa 2 (Pin 2), el cual se induce por JA. Pero de acuerdo con Farmer y Ryan (1990) la concentración para inducir el Pin es 1×10^{-9} M, la cual es mucho menor que la necesaria para inducir tuberización (1×10^{-7} M). En consecuencia es posible que Jackson y Willmitzer no hayan tenido éxito en inducir la tuberización debido a una insuficiente incorporación de JA por la planta.

El inicio de la tuberización esta regulado por un balance entre los niveles endógenos de GAs y JA (Okasawa, 1960). Las plantas utilizadas por Jackson y Willmitzer son del tipo de maduración temprana, lo que sugiere la presencia de altos niveles de GAs endógenas. Para inducir tuberización en este tipo de plantas es necesario una disminución de los niveles de GAs y un incremento de los niveles de JA (Koda, 1997).

Las GAs inhiben la tuberización y el tratamiento con un inhibidor de GAs en *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* es capaz de inducir tuberización en condiciones de DL (Jackson y Pratt, 1996).

El grupo *Tuberosum* está adaptado a madurar y producir tubérculos bajo DL

(Rieman, 1962). Esta adaptación puede deberse en parte a la superación del efecto inhibitor de la tuberización por los alelos *Ga1* productores de GAs u otras fuentes de GAs. La respuesta a la tuberización en DL parece estar controlada por la interacción de inhibidores (posiblemente GA_3) y promotores (Ewing y Wareing, 1978; Stoddart, 1976). El grupo *Tuberosum* aparentemente tiene la habilidad de deprimir la actividad giberelina en DL mientras que *Andigena* no (Bamberg y Hannemman, 1991).

Nuestros resultados indican que el tratamiento foliar con JA promueve tuberización independientemente del fotoperíodo; las estacas tratadas bajo condiciones de DL generan tubérculos significativamente más grandes que en OC, pero el inicio de tuberización fue el más prolongado (45 días) comparado con el resto de los tratamientos fotoperiódicos utilizados. Así como el fitocromo controla la actividad de la lipoxigenasa en plántulas es posible que la longitud del fotoperíodo afecte los niveles de jasmonatos via cambio de la actividad lipoxigenasa y/o enzimas relacionadas (Koda y Kikuta, 1991).

De todos los PGRs utilizados sólo JA tiene un efecto significativo sobre el incremento de PS de los tubérculos. El incremento de PS provocado por JA podría estar relacionado con la actividad inductora de expansión celular de esta fitohormona (Takahashi et al., 1994). Es conocido que previamente a la expansión celular, JA causa considerable incremento en sacarosa en la célula y también en los niveles de polisacáridos de la pared celular como celulosa, hemicelulosa y pectina (Takahashi et al., 1995).

LA promovió tuberización bajo DC, pero el PS de los tubérculos fue menor que el obtenido con JA; posiblemente LA promueve tuberización, pero no expansión celular. Se ha reportado que otro precursor de JA, 12-oxo-PDA, posee tanto actividad inductora de tuberización como de expansión celular en papa (Koda, 1997). Como se esperaba, SHAM, inhibidor de la biosíntesis de JA, retardó tuberización y redujo el PS de los tubérculos.

La tuberización es retardada por giberelinas; niveles decrecientes de GA_3 bajo condiciones de DC tienen un efecto dual: disminución de la elongación del estolón y estimulación de la tuberización (Tizio, 1979; Vreugdenhil y Struik, 1989).

UNZ (inhibidor de la biosíntesis de GA₃) reduce el crecimiento longitudinal y promueve levemente tuberización tanto en OC como en DC. El comportamiento de este regulador fue similar a paclobutrazol en explantos cultivados en luz (16 h) y en oscuridad (Pelacho et al., 1994). Paclobutrazol estimula iniciación de la tuberización temprana e inhibe el crecimiento del tallo (Simko, 1993). El modo de acción de este compuesto (a concentraciones apropiadas) en relación al desarrollo temprano de los tubérculos involucra tanto un efecto inhibitorio de los niveles de GAs, lo cual es un requisito para tuberizar (Hammes y Nel, 1975) y la habilidad de conducir asimilados a los órganos tuberosos (Deng y Prange, 1988; Steinitz et al., 1991). Simko (1993) sostiene la idea que para la tuberización inducida por paclobutrazol es necesario una concentración umbral de giberelinas.

Si bien se esperaba haber encontrado un mayor porcentaje de tuberización con la aplicación de UNZ, los resultados obtenidos podrían deberse a niveles endógenos altos de GAs en las estacas uninodales.

Por lo tanto cada regulador puede desencadenar una cascada metabólica diferente que dispararía la inducción o inhibición de la tuberización en *Solanum tuberosum* L. Además, JA y su precursor LA mostraron diferentes comportamientos en estos procesos; sólo JA tiene un efecto directo sobre el incremento de PS de los tubérculos en cualquier condición fotoperiódica.

La aplicación de JA por microgota a estacas uninodales afectó la morfología de las raíces como fuera descrito por Ravníkar et al. (1990). A bajas concentraciones de JA el sistema radical crece normalmente y a altas concentraciones las raíces se acortan y engrosan (Ravníkar et al., 1992).

Aplicaciones de 1 µM de JA resulta en una mayor diferenciación del sistema radical con presencia de muchas raíces adventicias. El alargamiento del sistema radical facilita la captación de agua y nutrientes del medio (Dermastia et al., 1994).

La inducción de la tuberización de plantas de papa por PGRs exógenos es comercialmente significativa y la micropropagación de plántulas *in vitro* (microplantas) es un importante método de propagación (Dodds, 1988). Con apropiadas condiciones de cultivo, las yemas axilares de las microplantas pueden ser inducidas para formar microtubérculos aéreos, los cuales son convenientes

para obtención de germoplasma (Estrada et al., 1986) y eventualmente para ser usados en programas de papa semilla (Ranalli et al., 1994).

El uso comercial de citocininas para estimular la formación de tubérculos de papa bajo OC esta bien establecido y estos tratamientos son utilizados para la propagación *in vitro* (Tovar et al., 1985; Estrada et al., 1986). La formación de microtubérculos con alto PF es considerablemente aumentada en luz (Slimmon et al., 1989) pero en luz la inactivación de citocininas resulta en un menor porcentaje de tuberización (Pelacho y Mingo-Castel, 1991).

Finalmente, la aplicación de JA por microgota a microplantas de papa cultivadas *in vitro* produce en un período menor de tiempo, mayor número de tubérculos y de mayor peso seco, así como también plantas más vigorosas independientemente de las condiciones fotoperiódicas a las que fueron expuestas.

EFFECTO DEL FACTOR RADICAL SOBRE LA EXPRESION DE LA TUBERIZACION

INTRODUCCION

El sistema de microplantas brinda un modelo experimental muy conveniente para estudiar la tuberización (Lopez-Delgado y Scott, 1997) permitiendo la regulación de muchos de los factores internos y externos que la afectan, por lo tanto se constituye en una herramienta muy útil para investigar la manera en que el factor radical influye sobre este proceso en *Solanum tuberosum* L. cv. Spunta.

Numerosas evidencias demuestran que las raíces son sitios de síntesis de GAs (Butcher, 1963; Phillips y Jones, 1964; Jones y Philips, 1966; Abdala et al., 1995). GA₃ y otras GAs, dependiendo de la dosis, retardan o inhiben la tuberización en planta entera (Okasawa, 1960; 1967), en estacas (Tizio, 1964b; 1966; 1971), en estolones subcultivados *in vitro* (Koda y Okasawa, 1983) y secciones de tallo (Tizio, 1964b; 1966; 1971). Sin embargo, promueven el crecimiento caulinar de estolones (Guiñazú et al., 1988; Tizio, 1979; Harris, 1992).

La actividad tipo giberelina en raíces y estolones disminuye con la estimulación de la tuberización en DC (Racca y Tizio, 1968; Railton y Wareing, 1973). Tratamientos con CCC, el cual bloquea la biosíntesis de GAs promueve tuberización bajo fotoperíodos desfavorables. Tratamientos con CCC (Guiñazú et al., 1988) y otros inhibidores de la biosíntesis de GAs (Simko, 1993) pueden estimular la formación de tubérculos en estacas cultivadas *in vitro*.

La tuberización también es promovida por extirpación periódica de las raíces o por inhibición del crecimiento radical con altas dosis de auxinas (Tizio, 1964 a,b,c; 1969; Tizio et al., 1985). En contraste, cuando la formación de raíces es estimulada con bajas dosis de auxinas (ácido indol-butírico o ácido naftalen acético) la tuberización se retrasa (Tizio, 1964b; Tizio, 1966)

Estos descubrimientos condujeron a formular la hipótesis de que las raíces sintetizan un "factor radical" con propiedades tipo giberelinas, el cual es responsable de la prolongación del crecimiento del estolón y el retardo de la

tuberización (Tizio, 1964; 1966; 1979; Tizio y Golenioswki, 1985).

Las sustancias tipo GAs en raíces de estacas fueron identificadas como GA₃ (Abdala et al., 1995) y se sugiere que esta giberelina podría ser el factor radical responsable de retardar la tuberización en plantas de papa.

OBJETIVO

Evaluar los efectos de la aplicación exógena de JA y GA₃ como posible factor radical que regula la tuberización.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Para los bioensayos que a continuación se describen se utilizaron plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Spunta) cultivadas en medio MS con la adición de sacarosa al 3%, crecidas a luz continua y a 25°C durante 28 días.

Bioensayo

Estacas uninodales de papa se cultivaron en medio WNM en condiciones fotoperiódicas de DC y a una temperatura de 18-20°C.

Se realizaron dos experiencias paralelas: 1) con estacas que al momento de la aplicación de los reguladores presentaban un sistema radical bien desarrollado, y 2) con estacas que al momento de la aplicación de los reguladores aún no habían desarrollado el sistema radical. Los diferentes reguladores se aplicaron mediante una microgota (50 µl) sobre la yema axilar y la lámina foliar de las estacas; para ello se utilizaron los siguientes PGRs:

Control	Agua
GA ₃	8 µM
JA	8 µM
GA ₃ + JA	8 µM + 8 µM
GA ₃ + SHAM	0.1 µM + 50 µM
JA + UNZ	0.1 µM + 0.2 µM

Se realizaron mediciones semanales del crecimiento de raíces, estolones y tubérculos y al cabo de 50 días se midió PF y PS de los diferentes tejidos, como así también longitud de raíces y estolones.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo con un diseño aleatorio, con 20 repeticiones por tratamiento y dos repeticiones por experimento. Los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de la varianza y test LSD de Fisher.

RESULTADOS

La presencia de raíces retardó 14 días la formación de tubérculos. En ausencia de sistema radical el porcentaje de tuberización alcanzó un 95% a los 66 días de iniciado el tratamiento con JA en condiciones de DC (Figs. 1 y 2).

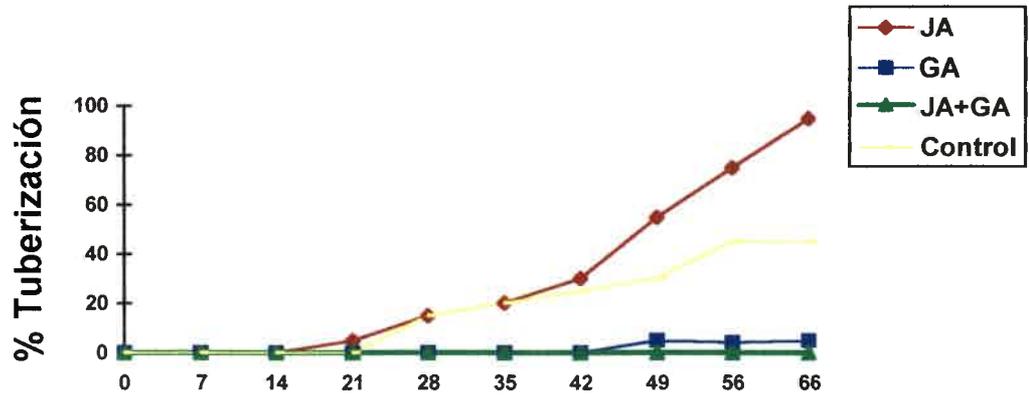
La aplicación de JA, solo o conjuntamente con GA₃, a estacas con un sistema radical desarrollado condujo a la formación de estolones de intensa pigmentación roja debido a la presencia de antocianinas (Fig. 8). La inhibición de la síntesis de GA₃ por UNZ y la aplicación conjunta de JA, produjo un mayor porcentaje de estacas tuberizadas (70%) que las tratadas con JA solamente (30%) a los 42 días de iniciadas las experiencias (Figs. 1 y 4).

En ambas experiencias se observaron modificaciones exo-morfológicas en las raíces debido a la aplicación de JA. Las estacas sin raíces, tratadas con JA, desarrollaron a posteriori un sistema radical de mayor grosor y menor longitud que las tratadas con GA₃. Cuando se aplicaron los dos reguladores conjuntamente las raíces se acortaron y engrosaron, y los estolones se ramificaron al igual que con el tratamiento de GA₃ sola (Fig. 7).

Las estacas con un sistema radical desarrollado que fueron tratadas con JA o con la mezcla JA+GA₃ sufrieron también los mismos cambios morfológicos en su sistema radical que las estacas sin raíces al momento de la aplicación de los PGRs (Fig. 8). En consecuencia GA₃ no revierte el efecto de JA sobre la exomorfología de las raíces. Las estacas tratadas con JA+UNZ desarrollaron un sistema radical con las mismas características exomorfológicas que las tratadas con JA y se observó

una compactación del tallo debido a la aplicación de UNZ.

A



B

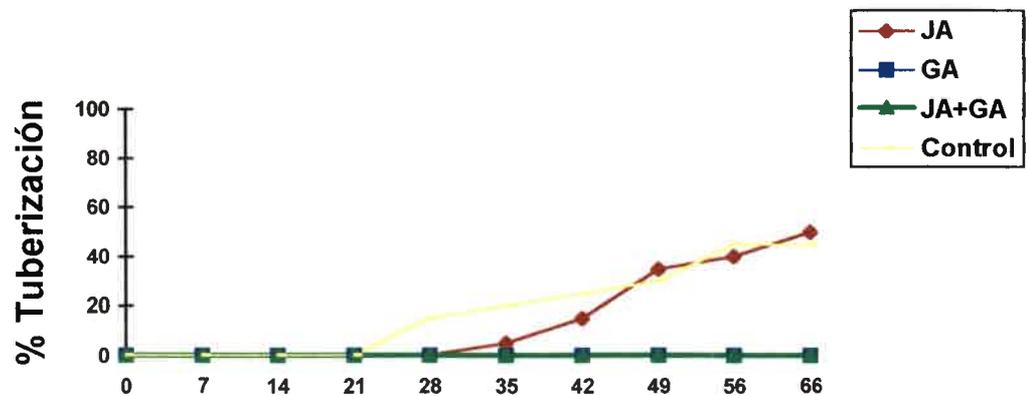


Fig. 1. Efecto del JA, GA₃ y JA+GA₃. **A)** aplicado por microgota a estacas uninodales sin sistema radical; **B)** aplicado por microgota a estacas uninodales con sistema radical desarrollado. Ordenada: porcentaje de tubercización. Abscisa: días de iniciado el tratamiento.

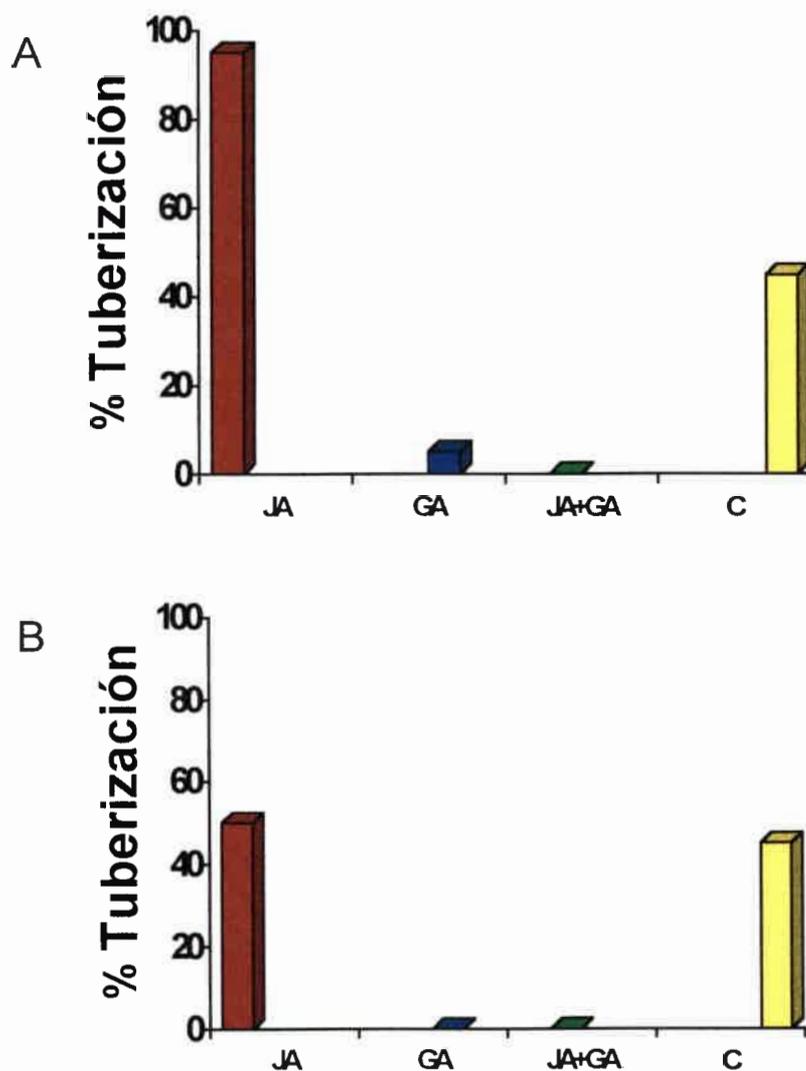


Fig. 2. Efecto del JA, GA₃ y JA+GA₃ (8 μM). A) aplicado por microgota a estacas uninodales sin sistema radical; B) aplicado por microgota a estacas uninodales con sistema radical desarrollado. Ordenada: porcentaje de tuberización a 66 días de iniciado el cultivo *in vitro* de estacas uninodales de papa.

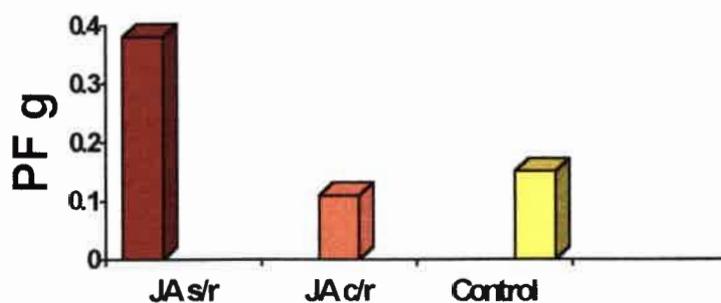
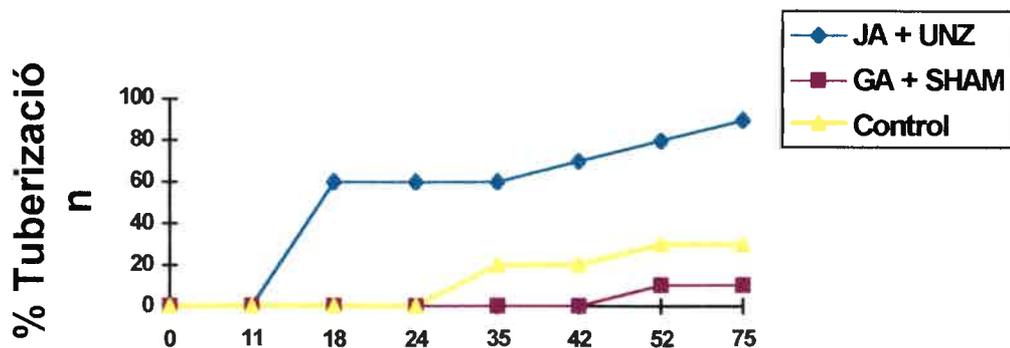


Fig. 3. Peso fresco de tubérculos producidos por las estacas de papa cultivadas *in vitro* a 66 días de iniciado el tratamiento. Ordenada: peso fresco de tubérculos expresado en gramos. Abscisa: tratamientos con JA aplicado a estacas con sistema radical desarrollado (JA c/r) y a estacas sin sistema radical (JA s/r).

A



B

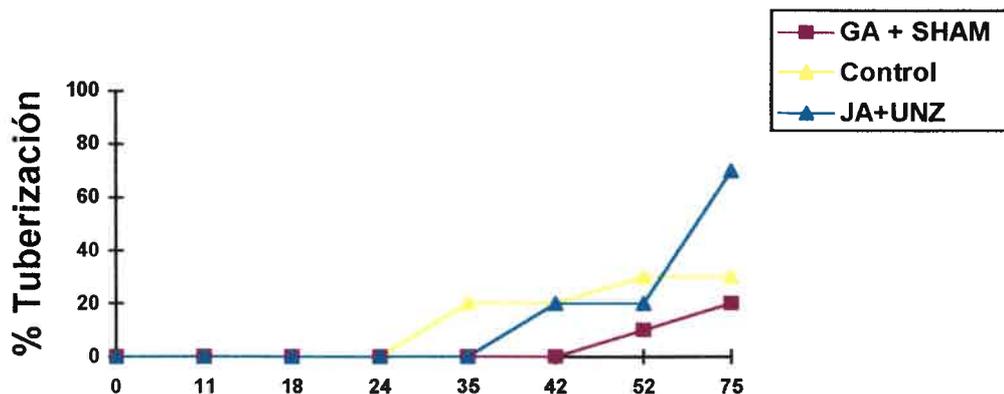


Fig. 4. Efecto del JA+UNZ y GA₃+SHAM. **A)** aplicado por microgota a estacas uninodales sin sistema radical; **B)** aplicado por microgota a estacas uninodales con sistema radical desarrollado. Ordenada: porcentaje de tuberización. Abscisa: días de iniciado el tratamiento.

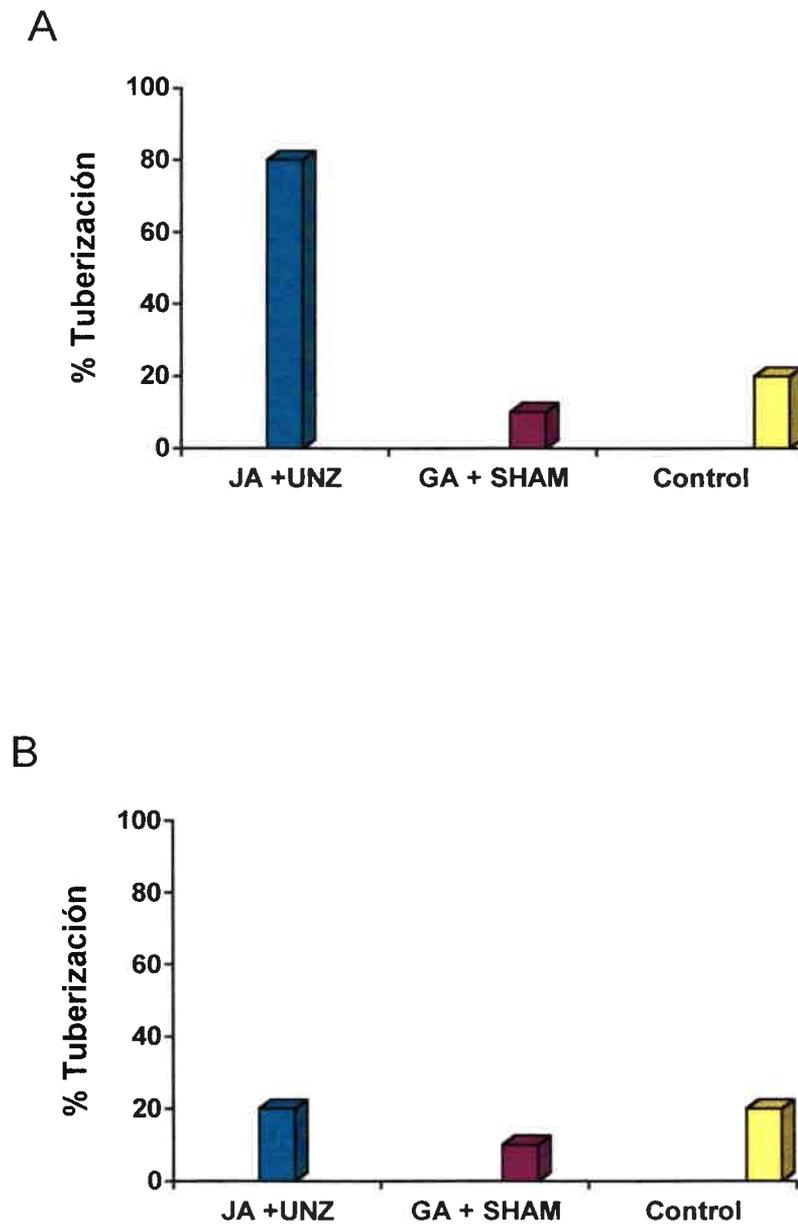
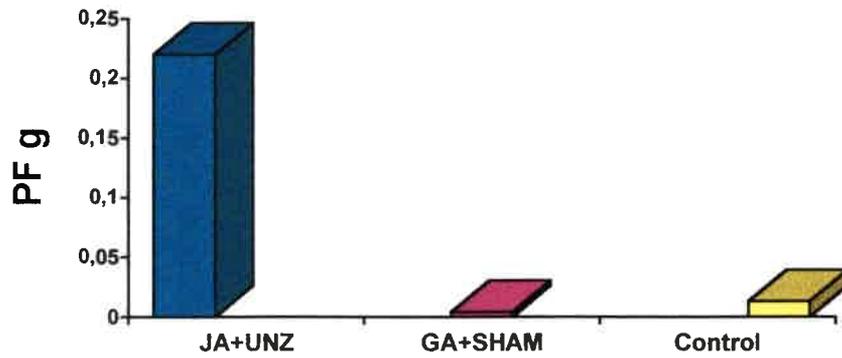


Fig. 5. Efecto del JA+UNZ y GA₃+SHAM. **A)** aplicado por microgota a estacas uninodales sin sistema radical; **B)** aplicado por microgota a estacas uninodales con sistema radical desarrollado. Ordenada: porcentaje de tuberización a los 52 días de iniciado el cultivo *in vitro* de estacas uninodales de papa. Abscisa: concentraciones de JA+UNZ (0.1 μ M + 0.2 μ M) y GA₃+SHAM (0.1 μ M + 50 μ M).

A



B

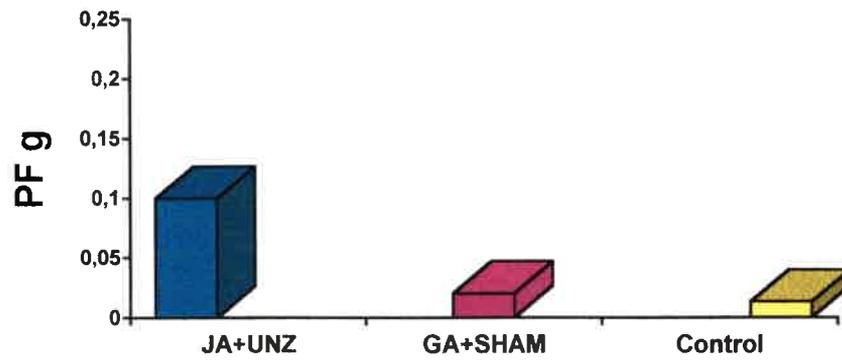


Fig. 6. Peso fresco de tubérculos producidos por estacas de papa cultivadas *in vitro* a oscuridad continua a 75 días de iniciado el tratamiento. **A)** estacas uninodales sin sistema radical; **B)** estacas uninodales con sistema radical desarrollado.

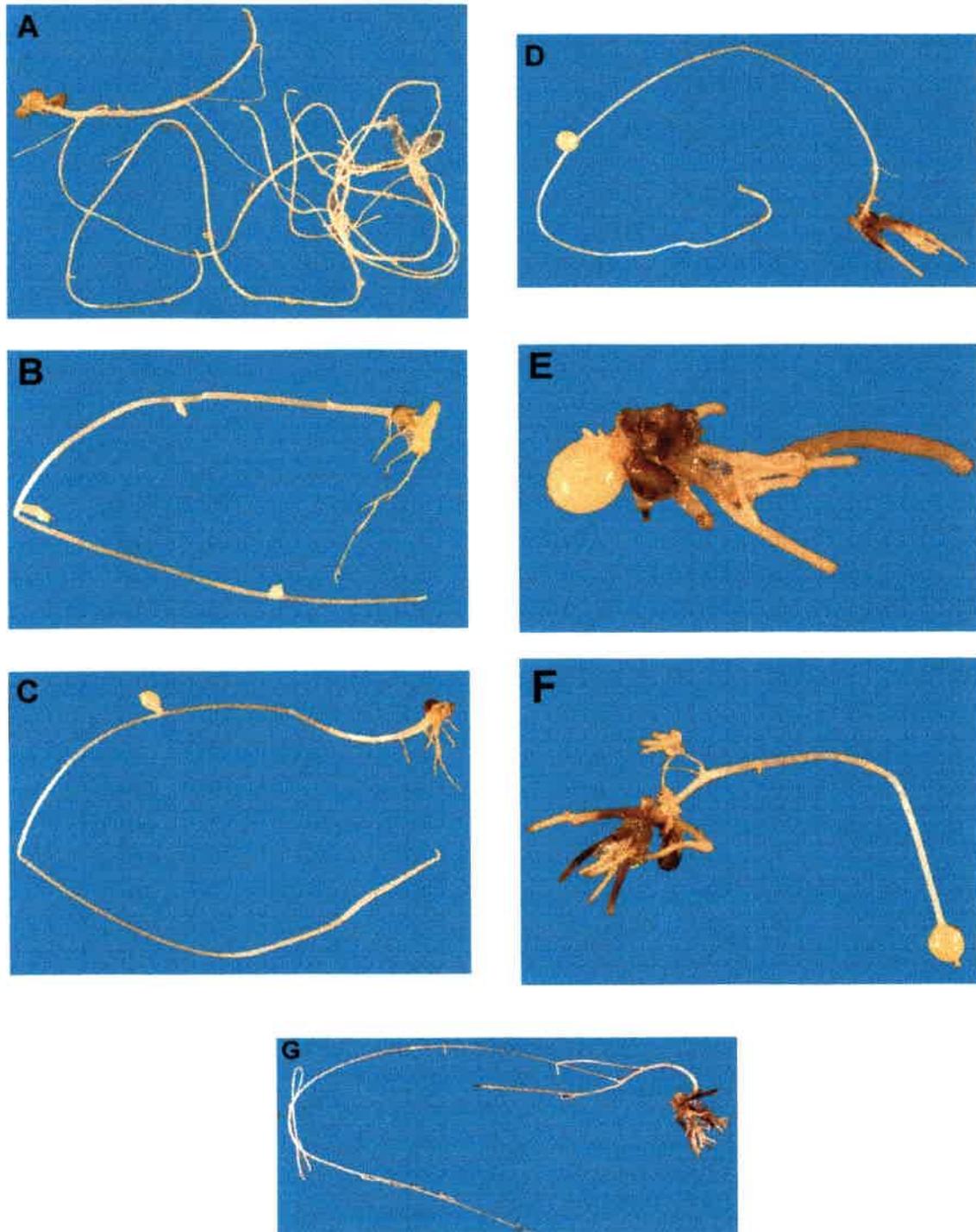


Fig. 7. Efecto del JA, GA₃ y JA+GA₃ aplicado por microgota a estacas uninodales sin sistema radical a los 66 días de iniciado el cultivo *in vitro* de las estacas. **A y B:** estaca uninodal tratada con GA₃; **C:** control; **D, E y F:** estacas uninodales tratadas con JA; **G:** estacas uninodales tratadas con JA+GA₃.

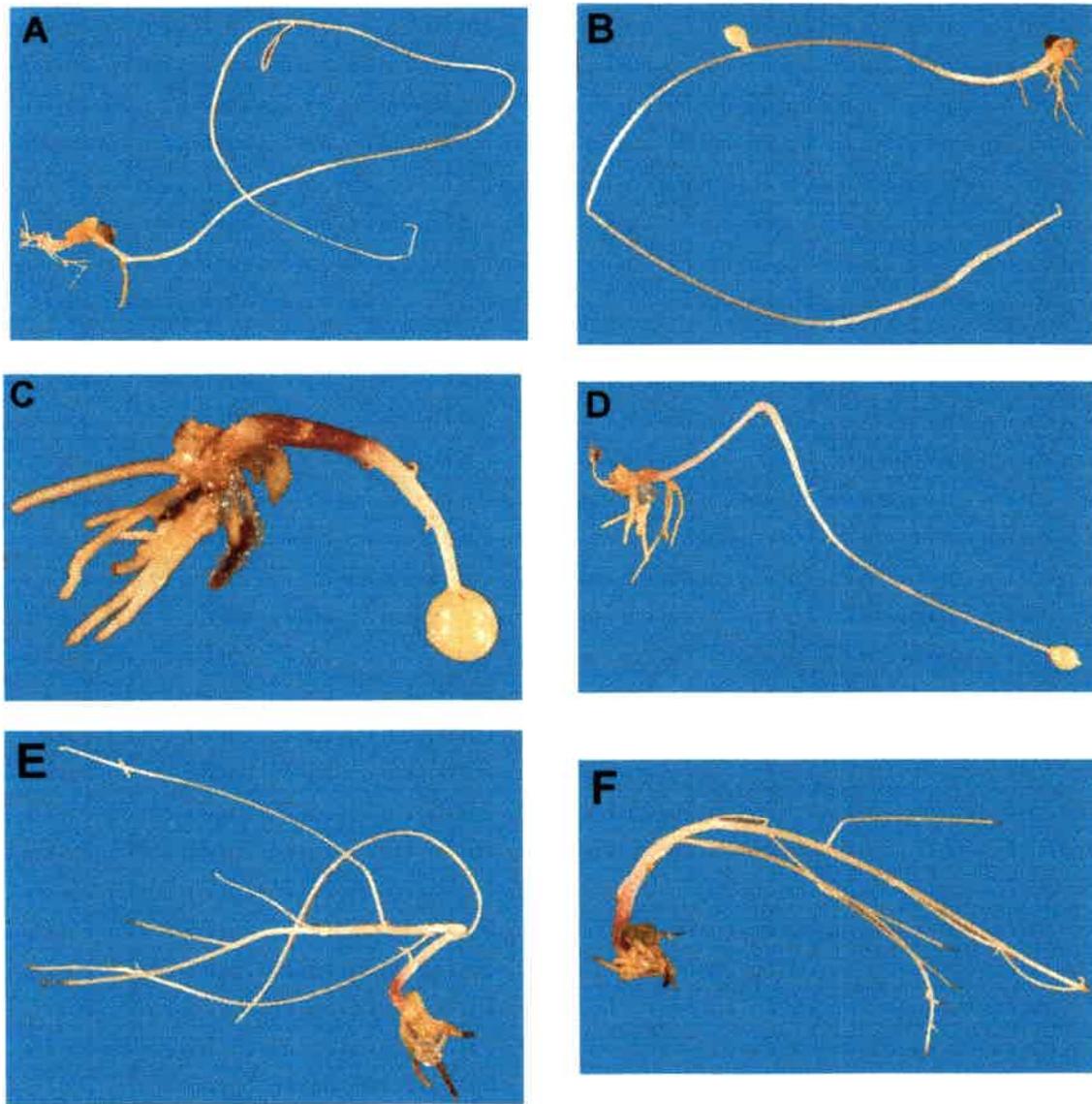


Fig. 8. Efecto del JA, GA₃ y JA+GA₃ aplicado por microgota a estacas uninodales sin sistema radical a los 66 días de iniciado el cultivo *in vitro* de las estacas. **A**, estaca uninodal tratada con GA₃; **B**, control; **C** y **D**, estacas uninodales tratadas con JA; **E** y **F**, estacas uninodales tratadas con JA+GA₃.

Análisis Estadístico

En el ensayo bajo condiciones de día corto de la aplicación de JA a estacas con o sin sistema radical, la variable objeto de análisis fue peso seco de tubérculos. Los tratamientos fueron: JA aplicado a estacas sin sistema radical (JA s/r), JA aplicado a estacas con sistema radical (JA c/r) y estacas controles.

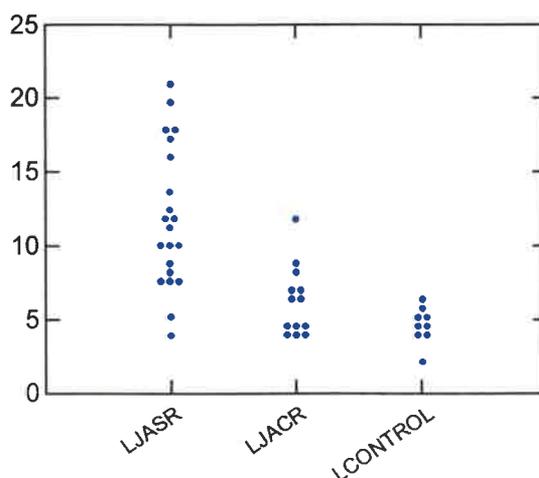


Fig. 9. Diferencias de medias (Test LSD de fisher) para la variable peso seco de tubérculos de estacas con o sin sistema radical, tratadas con JA.

El análisis de las diferencia de medias (Test LSD de fisher) mostró que solo el tratamiento JA-s/r difiere de los otros dos, siendo estos últimos indistinguibles estadísticamente.

En el ensayo bajo condiciones de día corto de la aplicación de JA y uniconazol, y GA₃ y SHAM, a estacas con o sin sistema radical, la variable objeto de análisis fue peso seco de tubérculos. Los tratamientos fueron: JA+UNZ s/r, JA+UNZ c/r, GA₃+SHAM s/r, GA₃+SHAM c/r y control.

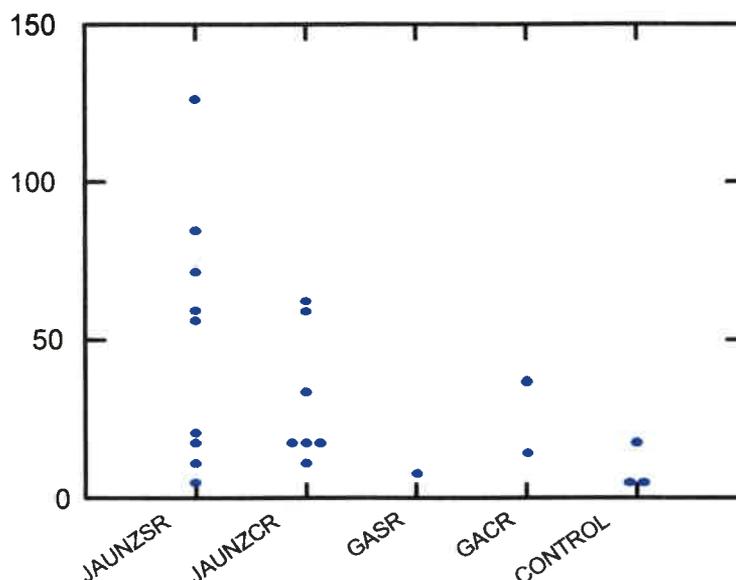


Fig. 10. Diferencias de medias (Test LSD de Fisher) para la variable peso seco de tubérculos de estacas con o sin sistema radical tratadas con JA+UNZ y GA₃+SHAM.

El análisis de diferencias de medias mostró que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

DISCUSION

Tizio (1964a,b,c; 1966; 1979) y Tizio y Golenioswki (1985) plantearon la hipótesis de que la presencia de raíces retarda la tuberización por el aporte de una sustancia que ellos denominan "factor radical". En un trabajo posterior se propone que esta sustancia podría ser GA₃ (Abdala et al.,1995). En los experimentos descritos pudimos comprobar que el sistema radical retarda la tuberización *in vitro* de estacas uninodales de papa; dicho efecto retardante de las raíces se debe al aporte de GAs. Trabajos anteriores demostraron una dramática disminución de las sustancias tipo GAs en raíces de papa cultivadas *in vitro* con la aplicación de CCC (Tizio y Golenioswki, 1985). Los tratamientos con CCC no sólo reducen el contenido de GA₃ de raíces sino que también inhiben la rizogénesis (Abdala, 1995). Cuando se inhibió la bió-síntesis de GAs con UNZ las raíces presentes en las estacas no retardaron la tuberización. A diferencia de lo que ocurre con CCC, el uso de UNZ no afectó la rizogénesis y la aplicación conjunta con JA promovió

tuberización.

La hipótesis de una hormona putativa en la tuberización (Gregory, 1956) está siendo reemplazada por la idea de una regulación conjunta entre los niveles de promotores e inhibidores. Los resultados de este trabajo sugieren que las raíces juegan una función importante en la tuberización de plantas de papa aportando una sustancia o factor radical (posiblemente GA_3) y creando un balance interno que evitaría el desencadenamiento de la tuberización temprana.

La aplicación de JA solo o conjuntamente con GA_3 produjo en los estolones de las estacas enraizadas una llamativa acumulación de compuestos antociánicos. La inducción por JA y Me-JA de un gran espectro de metabolitos secundarios ha sido bien documentado no sólo en cultivo de células en suspensión (Beerhues y Berger, 1995; Dittrich et al., 1992; Gundlach et al., 1992; Mizukami et al., 1993) sino también en plantas diferenciadas (Aerts et al., 1994; Baldwin et al., 1994, Bodnaryck, 1994; Doughty et al., 1995). Al respecto Gross y Parthier (1994) han informado que JA promueve la síntesis de flavonoides tales como las fitoalexinas. Además Me-JA estimula la acumulación de antocianinas en hipocótilos de plántulas de soja crecidos en luz (Franceschi y Grimes, 1991), en hojas de plántulas de *Arabidopsis* (Feys et al., 1994) y en corolas aisladas de *Petunia* (Tamari et al., 1995). Por otro lado plantas de tomate bajo estrés de nitrógeno también acumulan antocianinas debido al exceso de esqueletos carbonados que son producidos cuando la fenilalanina es degradada para suplir el amonio requerido para el crecimiento de las raíces (Bongue y Phillips, 1995).

Puesto que las estacas de papa tratadas se cultivaron en un medio pobre en nitrógeno, es probable que esta condición sumada a la aplicación exógena de JA estimule la síntesis de antocianinas a partir del sustrato que estaría brindándole las raíces de la estaca. Un estudio de mayor profundidad se requerirá para verificar si JA estimula la síntesis de antocianinas de forma independiente al estrés por nitrógeno, o bien si es el estrés el factor que desencadena, a través de la síntesis de jasmonatos, la biosíntesis del pigmento.

La acumulación de antocianinas que es estimulada por JA en plantas iluminadas podría proveer alguna protección a los excesos de radiación (Franceschi y Grimes, 1991).

EFFECTO DEL ACIDO JASMONICO EN LA EXPANSION CELULAR

INTRODUCCION

La morfogénesis en plantas está controlada tanto por la frecuencia y la dirección celular como por la expansión celular. La primera señal de la tuberización en plantas de papa es la cesación del crecimiento del estolón; subsecuentemente ocurre un ensanchamiento de la región subapical. Este ensanchamiento es debido en un principio a la expansión celular en el tejido medular (Booth, 1963; Koda y Okasawa, 1983).

JA y Me-JA poseen diversos efectos sobre el crecimiento de las células, por ejemplo, inhiben la división celular (Ueda y Kato, 1982) y la elongación celular (Ueda et al., 1995), y promueven la expansión celular (Takahashi et al., 1994).

La actividad de inducir expansión celular en parénquima amiláceo de papa es específica de JA ya que varias fitohormonas (IAA, GA, ABA, BA) así como el precursor de etileno (ACC) no tuvieron efecto apreciable en el tamaño de las células (Takahashi et al., 1994).

El crecimiento de las células es determinado principalmente por dos factores: la presión de turgencia dentro de la célula y la extensibilidad de la pared celular (Cleland, 1971). La presión de turgencia provee la fuerza conductora para el crecimiento celular y también juega una función importante en el metabolismo de la pared celular (Labavich, 1981). Las microfibrillas de celulosa altamente organizadas confinan la expansión celular debida a la turgencia al eje axial mayor del crecimiento (Green y Poethig, 1982; Delmer y Armor, 1995). Por ello, el correcto orden de las microfibrillas de celulosa es esencial para la diferenciación celular (Green y Selker, 1991). El ordenamiento de las microfibrillas de celulosa es controlado por los microtúbulos corticales (Williamson, 1991; Cyr y Palevitz, 1995). La participación de los microtúbulos corticales en el control de la dirección de la expansión celular ha sido bien documentada por Shibaoka (1994). Abe et al., (1990) y Matsuki et al., (1992) demostraron la actividad de Me-JA en la disrupción de los microtúbulos corticales en células de tabaco y papa respectivamente. Aunque, la expansión de las células de la región subapical de los tallos laterales de

papa, que conduce a la tuberización *in vitro*, es acompañada por reorientación y no por disrupción de los microtúbulos (Fujino et al., 1995).

La extensibilidad de la pared celular ha sido correlacionada con la composición de polisacáridos (Taiz, 1984). Además, el ablandamiento de la pared celular (aumento en extensibilidad) parece estar estrechamente ligada a la síntesis de polisacáridos (Montague, 1995). Previamente a la inducción de la expansión celular, JA causa un considerable incremento en los niveles de sacarosa en la célula, sin embargo no afecta los niveles de glucosa y fructuosa (Takahashi, 1995). La acumulación de sacarosa parece derivar exclusivamente del almidón, el cual decrece durante la expansión (Takahashi, 1995). JA también incrementa los niveles de polisacáridos de la pared celular: celulosa, hemicelulosa y pectina (Koda, 1997).

Si bien Koda (1997) afirma que la expansión de las células en respuesta a JA es específica de aquellas situadas en la región subapical del estolón y células de tubérculos jóvenes, en las experiencias *in vitro* se pudo observar la formación de tubérculos en yemas laterales de estacas cultivadas *in vitro* sin previa formación de estolón. Por otra parte hemos determinado niveles endógenos de JA muy altos en yemas que disminuyen notablemente con la brotación. Esta observación condujo a pensar que las células de las yemas podrían expandirse por el efecto de JA conduciendo al crecimiento del brote.

OBJETIVO

Estudiar la acción de JA sobre el agrandamiento celular en yemas de tubérculos de *Solanum tuberosum* L. cv. Spunta cultivadas *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Yemas de tubérculos de papa fueron extraídas de tubérculos maduros y esterilizadas con hipoclorito de sodio 0.5% por 30 min, alcohol 70% y agua estéril.

Bioensayo

Las yemas fueron cultivadas en medio White basal a pH 5.6 suplementado con manitol 58 mM para mantener la presión osmótica del medio y solidificado con agar (Merck) al 0.7%. Una microgota de JA (50 µl) en distintas concentraciones fue aplicada sobre cada yema y las mismas se mantuvieron a oscuridad continua a 25°C durante 5 días. Los tratamientos fueron los siguientes:

Control	Agua
JA	3×10^{-8} M
JA	1×10^{-7} M
JA	3×10^{-5} M

Preparación de yemas para microscopía óptica

Las yemas fueron colocadas en FAA (alcohol etílico 96°, agua, formol, ácido acético glacial, 50/35/10/5), deshidratadas con alcohol-xilol e incluidas en parafina. Luego se seccionaron longitudinalmente y transversalmente con micrótopo (secciones de 10 µm) y se tiñeron con una combinación de safranina y verde rápido para su posterior observación en microscopio óptico *Carl Zeiss Standart K* con cámara fotográfica incorporada.

Medición del área celular

Los preparados histológicos fueron procesados mediante un analizador de imágenes, Programa VIDAS 25 de Kontron, para la medición del área celular. Los valores obtenidos como número de pixes fueron multiplicados por el factor de área (F=0,043).

Se delimitaron dos zonas de análisis, la zona 1 corresponde a las células del corpus inmediatamente por debajo de la túnica y la zona 2 correspondiente a las células del meristema medular, a la altura del origen de los primordios foliares (Fig. 1).



Fig. 1. Yema de tubérculo de papa. Zona 1: células del corpus. Zona 2: meristema medular.

Diseño experimental

Para el análisis estadístico se seleccionaron las secciones transversales debido a que las zonas 1 y 2 podían ser mejor determinadas en estos cortes.

El experimento se realizó con cinco repeticiones y según un diseño completamente aleatorio. Cada repetición corresponde al promedio de cinco submuestras de la unidad experimental. Las variables registradas correspondieron al área celular en cada una de las zonas de cada yema.

Para ambas zonas, las áreas celulares se analizaron mediante análisis de la varianza previa transformación logarítmica para estabilizar las varianzas. La comparación de las medias se realizó mediante prueba LSD de Fisher.

RESULTADOS

Luego de 5 días de cultivo las yemas respondieron incrementando la expansión celular en todos tratamientos con JA. En la zona 1 el efecto de los tratamientos con JA fue altamente significativo ($p=0.0006$), mientras que los

tratamientos con JA 3×10^{-5} M y JA 1×10^{-7} M no se diferenciaron significativamente entre si (Fig. 2)

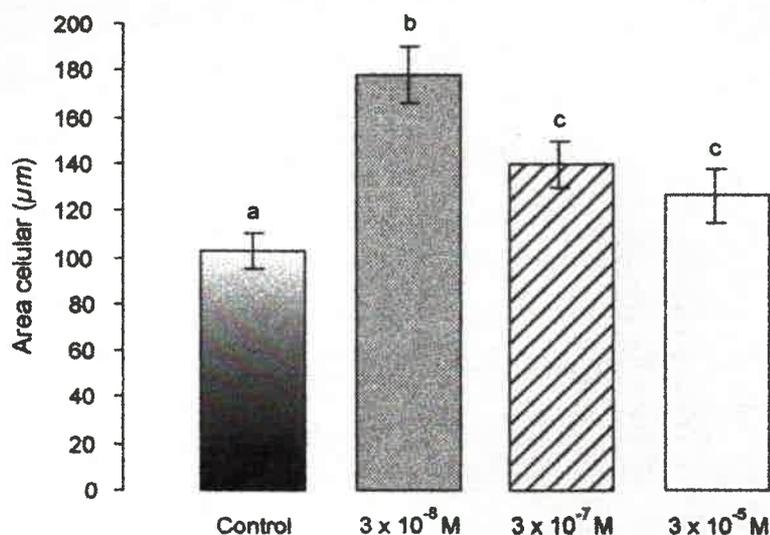


Fig. 2. Valores medios y desvíos estándares para el área celular de la zona 1 diferentes tratamientos con JA. Letras diferentes indican la diferencia estadística a un r de significancia del 5%.

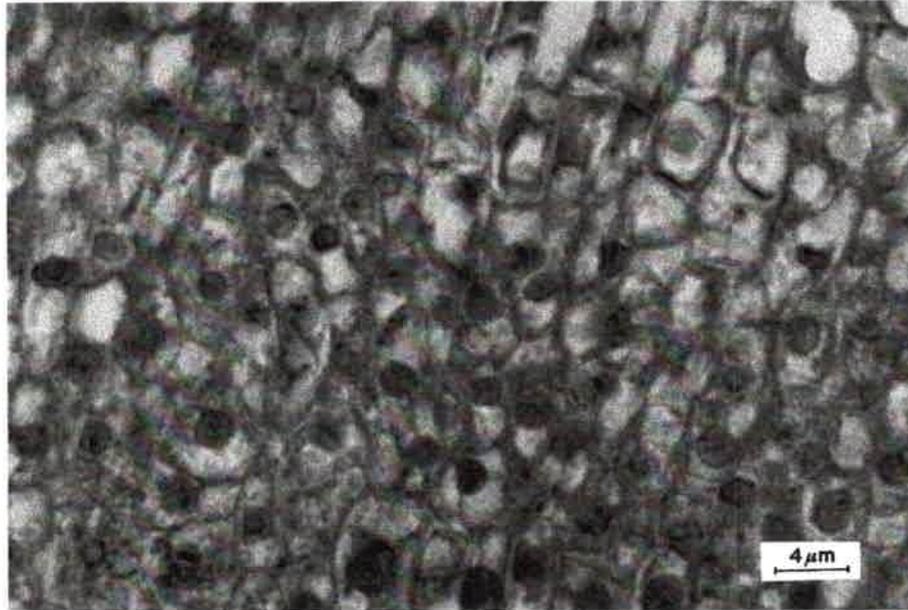
El tratamiento con JA 3×10^{-8} M tuvo la media más elevada (178.09 micras) la que difirió significativamente del control y del resto de los tratamientos (Tabla 1 y Fig. 3). A diferencia de lo observado en la zona 1, las células más basales (zona 2) no se mostraron afectadas por los distintos tratamientos con JA ($p=06650$) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medios y desvíos estándares para el área celular en la zona 1 y zona 2 con diferentes tratamientos de JA.

Tratamiento	n	Zona 1		Zona 2	
		media	± ee	media	± ee
Control	5	102.38	± 7.47	a	421.36 ± 37.04
JA 3×10^{-8} M	5	178.09	± 11.53	b	381.49 ± 29.14
JA 1×10^{-7} M	5	139.48	± 9.96	c	434.74 ± 20.11
JA 3×10^{-5} M	5	126.56	± 11.35	c	429.86 ± 44.99

Letras diferentes indican diferencias significativas a nivel del 5 %

A



B

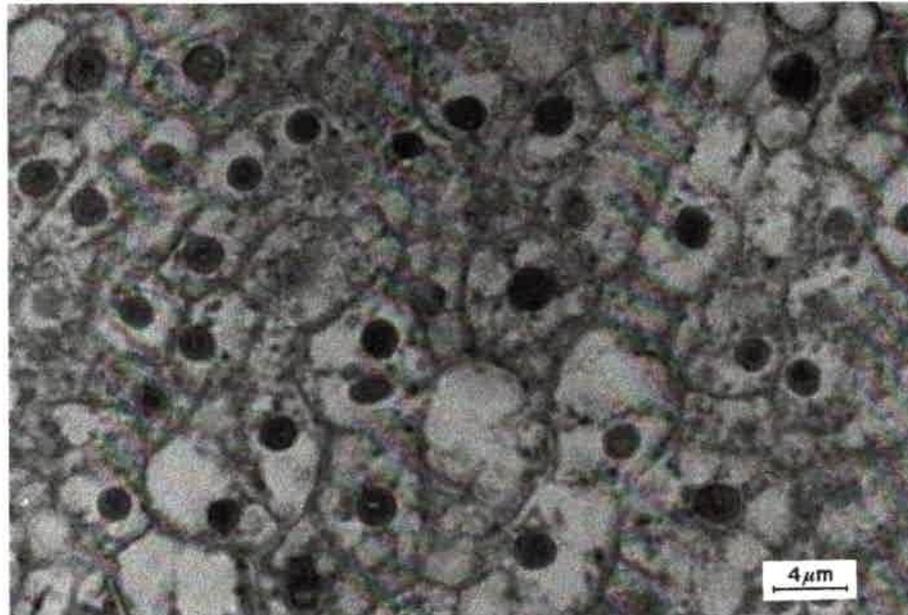


Fig. 3. Efecto de la aplicación exógena de JA sobre la expansión de células del corpus de yemas de tubérculo de papa. **A**, JA 3×10^{-8} M; **B**, control.

DISCUSIÓN

La expansión celular por acción de JA es atribuida a un incremento en la presión osmótica, a cambios en la acumulación de sacarosa, y además a cambios en la estructura de la pared celular. Más aún, la síntesis de celulosa es indispensable para la expansión celular inducida por JA. Inhibidores de la organización de microtúbulos (colchicina e isopropil N-fenilcarbamato) y de microfilamentos (citochalasin B) también inhiben fuertemente la expansión celular, sugiriendo que el citoesqueleto es también indispensable para la expansión celular inducida por JA (Takahashi et al., 1995).

Los resultados indican que JA es capaz de inducir expansión celular no sólo en células de parénquima amiláceo de papa como fuera demostrado por Takahashi (1994) sino también en yemas de tubérculos de papa fisiológicamente maduros.

Takahashi (1994) demostró que discos de parénquima amiláceo de papa se expandieron por acción de JA y lo hicieron en el lado basal en contacto con el medio que contiene JA, las células superiores no se expandieron. Pero cuando se expuso a los discos a Me-JA gaseoso obtuvieron la misma respuesta por lo que adjudicaron este efecto a una mayor disponibilidad de agua por el tejido.

Por el contrario en las yemas donde se aplica JA por microgota sólo las células del corpus (zona 1) en mayor contacto con la hormona se expandieron. Es posible también que las células del meristema medular (zona 2) no respondieran debido a que no tuvieron contacto directo con la hormona y que fuera necesario más de 5 días para que JA difundiera a estas células más alejadas de la superficie.

Las células cercanas a la túnica tiene menor diferenciación que las de la zona 2. En las células meristemáticas las microfibrillas de celulosa están orientadas al azar. La forma de una célula vegetal depende de la dirección de la expansión celular, particularmente de la orientación de las microfibrillas de celulosa en la pared (Green, 1980). La orientación es controlada por los microtúbulos corticales (Gunning y Hardham, 1982).

Un gradual detrimento en la respuesta a JA fue observado por Takahashi (1994) con el avance de la edad de los tubérculos. De ser así estas células requerirían concentraciones mayores de JA ya que son células más viejas, sin

embargo, nuestros resultados indican que las células basales no respondieron aún a concentraciones 1000 veces mayores.

La transformación de una yema a brote implica división y expansión celular; los altos niveles de JA endógenos en yemas de tubérculos de papa (Capítulo 1) y la capacidad de expansión de las células meristemáticas en respuesta a JA exógeno señalan al JA como la fitohormona que actúa directamente en las células del corpus induciendo su crecimiento.

La actividad inductora de la expansión celular de JA y Me-JA está asociada con la actividad inductora de tuberización (Koda, 1997).

A diferencia de los resultados obtenidos por el grupo de Takahashi (1994) la concentración que produjo mayor agrandamiento celular en yemas (3×10^{-8}) es menor que la requerida para el agrandamiento de las células del parénquima (3×10^{-5}). Por lo que diferimos con la idea de Koda (1997) quien sugiere que JA "per se" no sería la sustancia que induce tuberización "in situ" debido a que las concentraciones de JA requeridas para la expansión celular son mayores que las necesarias para explicitar tuberización. Este autor supone que un precursor de la síntesis de JA, 12-oxo- PDA, que posee ambos tipos de actividades sería el responsable de disparar la tuberización "in situ".

La aplicación exógena de JA a estacas uninodales de papa suele producir la formación de tubérculos en cadena, formados en las yemas meristemáticas del tubérculo anterior. Pero la razón para que no se forme un tubérculo sobre el tubérculo madre está dada por la regulación de otras hormonas endógenas como las giberelinas y no debida a un detrimento en la capacidad para responder a JA con el avance de la edad del tubérculo como afirma Koda (1997).

JA como tantos otros fitorreguladores que participan en complejos procesos morfogénicos como la tuberización no actúan independientemente sino que existe una regulación endógena que conduce a la explicitación de estos procesos.



CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Para profundizar sobre los procesos de estolonización y de tuberización en papa se analizó la regulación hormonal entre giberelinas y jasmonatos.

El proceso morfogénico de la transformación de yema a brote implica división celular y expansión; en dicho evento estaría involucrado el ácido jasmónico que actúa directamente en las células del corpus lo que favorece su crecimiento mediante expansión celular radial (Castro et al, 1999; resultados aceptados para su publicación en *J. of Plant Physiol.*). Durante el crecimiento de la planta los niveles de ácido jasmónico en follaje son altos, al igual que GA₁. Al respecto se puede postular que esta giberelina contribuye al crecimiento de los tejidos como lo hace en otras especies. Posteriormente los niveles de ácido jasmónico en follaje disminuyen con la ontogenia a diferencia de lo que ocurre en raíces. Esta disminución se puede explicar en términos de un transporte basípeto, ya que si el ácido jasmónico no es metabolizado a las formas solubles, ácido tuberónico y su aglucón, y transportado hacia los órganos subterráneos podría desencadenar respuestas de defensa.

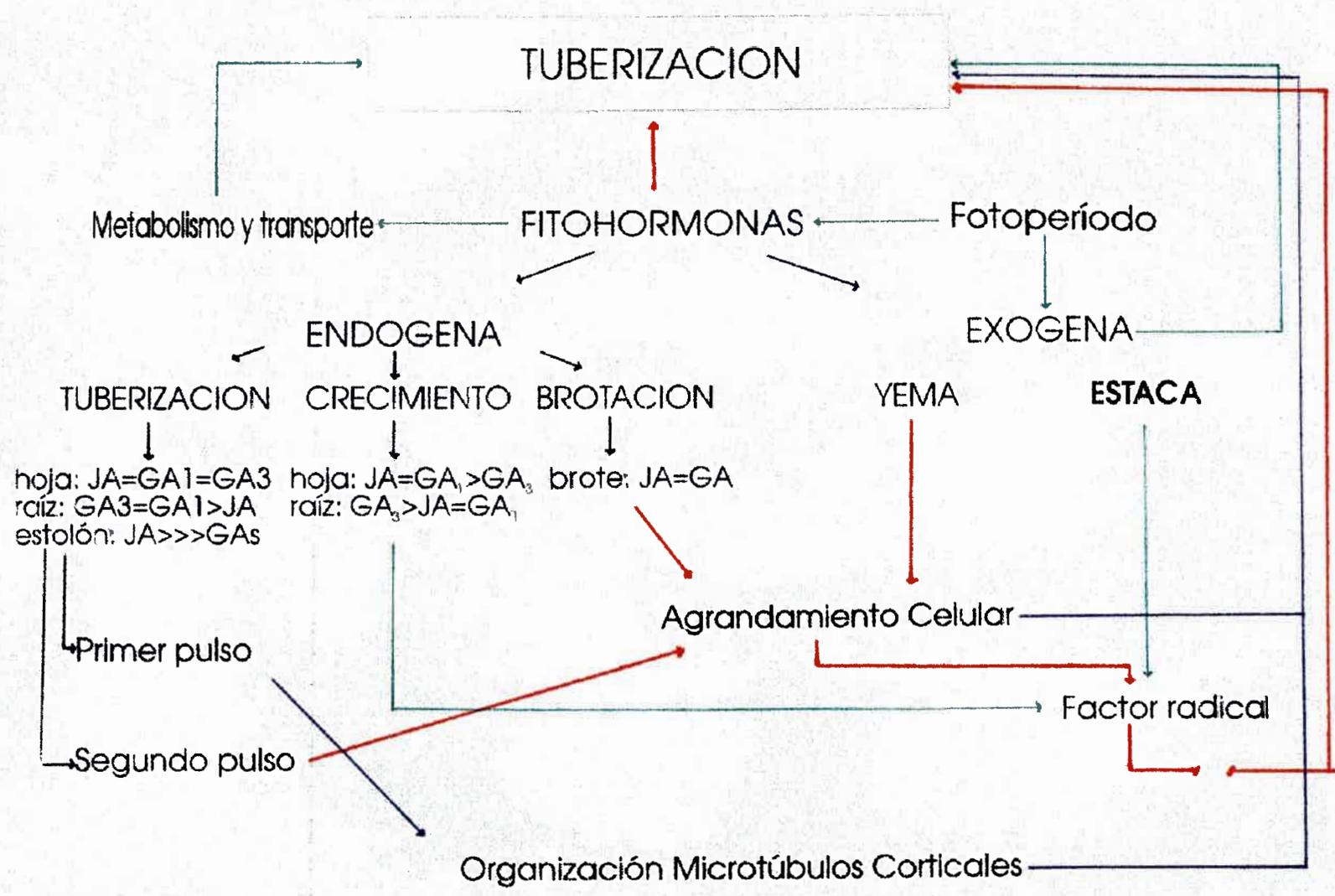
Las raíces juegan un papel muy importante como ente regulador de la tuberización. Al respecto las evidencias experimentales demostraron que las aplicaciones exógenas de ácido jasmónico a estacas enraizadas retardaron tuberización debido al aporte de giberelinas, y el uso de inhibidores de la biosíntesis de giberelinas como uniconazol revirtió el efecto. Por lo tanto, las raíces son importantes sitios de síntesis de estas fitohormonas que impiden la tuberización temprana (Castro et al., 1999; resultados aceptados para su publicación en *Potato Res.*). Esto puede corroborarse además por los altos niveles endógenos de GA₃ determinados en raíces.

En el curso de la ontogenia los niveles de ácido jasmónico en raíces aumentan, modificando el balance interno de jasmonatos y giberelinas favoreciendo de este modo la tuberización.

La primera señal de la tuberización es el cese del crecimiento del estolón que está acompañado por una disminución de los niveles de giberelinas tanto de

GA₁ como de GA₃. Subsecuentemente se produce un ensanchamiento de la región subapical debido a un cambio de orientación de los microtúbulos corticales que se disponen transversalmente al eje del estolón. Este cambio puede explicarse por la acción del ácido jasmónico, el cual se encuentra en concentraciones elevadas en esta etapa ontogénica. Al inicio de la tuberización el ensanchamiento es debido a la expansión radial de las células en el tejido medular, y como fuera demostrado el ácido jasmónico induce expansión celular a la misma concentración que induce tuberización *in vitro*. Los altos niveles de JA endógeno en esta etapa sugiere que esta fitohormona actúa "*in situ*" induciendo "*per se*" expansión celular y consecuentemente la formación del tubérculo.

A través del desarrollo experimental *in vitro* pudo comprobarse que el ácido jasmónico es un fuerte inductor de la tuberización bajo cualquier condición fotoperiódica ensayada; los tubérculos obtenidos son significativamente mayores en peso debido a la acción de este regulador sobre el agrandamiento celular. La técnica de la microgota empleada para arribar a estos conocimientos resultó ser efectiva debido a que se induce tuberización en corto tiempo y con menor concentración de hormona (Abdala et al., 1996).





REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdala G., Castro G., Guiñazú M., Tizio R., Miersch O. 1996 Occurrence of Jasmonic acid in organs of *Solanum tuberosum* L. and its effect on tuberization. *Plant Growth Regul.* 19: 139-143.
- Abdala G., Guiñazú M., Pearce D., Pharis R.P., Tizio R. 1995 Effect of CCC on tuberization and endogenous GA₃ in roots of potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings. *Plant Growth Regul.* 17: 95-100.
- Abe M., Shibaoka H., Yamane H., Takahashi N. 1990 Cell cycle-dependent disruption of microtubules by methyl jasmonates in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 156: 1-8.
- Aerts R, Gisi D., De Carolis E., De Luca V., Banmann T. 1994 Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J.* 5: 635-643.
- Aldridge D.C., Galt S., Giles D., Turner W.B. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *J. Chem. Soc. C.* pp 1623-1627.
- Anderson J. M. 1988 Jasmonic acid-dependent increases in the level of specific polypeptides in soybean suspension cultures and seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 7: 203-211.
- Baldwin Y., Schmeitz F., Ohnamis T. 1994 Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* Spegazzini y Comes. *J. Chem. Ecol.* 20: 2139-2157.
- Bamberg J. y Hannemman R. 1991 Characterization of a new gibberellin related dwarfing locus in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am. Potato J.* 68: 45-52.
- Barker W. G. 1953 A method for the *in vitro* culturing of potato tubers. *Science, NY,* 118: 384-385.

- Batutis E. y Ewing E. 1982 Far-red reversal of red light effect during long night induction of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization. *Plant Physiol.* 69: 672-674.
- Beerhues L. y Berger U. 1995 Differential accumulation of xanthonenes in methyl-jasmonates and yeast-extract-treated cell cultures of *Centarium erythraea* and *Centarium littorale*. *Planta* 197: 608-612.
- Bodnaryck R. 1994 Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard. *Phytochem.* 35: 301-305.
- Bongue-Bartelsman M. y Phillips D. 1995 Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 33(5): 539-546.
- Booth A. 1963 The role of growth substances in development of stolons, in: *The growth of the potato*. Ivins J.D. and Milthorpe F.L. (eds.), Butterworths, London, 1963, pp 99-113.
- Brückner C., Kramell R., Schneider G., Schmidt J., Preiss A., Sembdner G., Schreiber K. 1988 N[(-)jasmony]-S-tryptophan and a related tryptophane conjugate from *Vicia faba*. *Phytochem.* 27: 275-276.
- Butcher D. 1963 The presence of gibberellins in excised tomato roots. *J. Exp. Bot.* 14: 272-280.
- Castro G., Kraus T., Abdala G. 1999 Endogenous jasmonic acid and radial cell expansion in buds of potato tubers. *J. of Plant Physiol.* Aceptado.
- Castro G., Abdala G., Agüero C., Tizio R. 1999 Interaction between jasmonic and gibberellic acids on in vitro tuberization of potato plantlets. *Potato Res.* Aceptado.
- Claver F.K. 1967 Formación de yemas adventicias en tejidos de papa (*Solanum tuberosum* L.) *Rev. Fac. Agr. La Plata* (3º época) 43: 45-54.

- Claver F.K. y Montaldi E.R.. 1976 Reversión de la tuberización de la papa. Rev. Fac. Agr. La Plata 52: 31-36.
- Cleland R. 1971 Cell wall expansion. Annu. Rev. Plant Physiol. 22: 197-222.
- Coolbaugh R.C. 1983 Early stages of gibberellin biosynthesis. In: The biochemistry and physiology of gibberellins. Crozier A. (eds.), Praeger, New York. Vol 1, pp. 53-98.
- Crabalona L. 1967 Presence of levorotatory methyl jasmonate, methyl cis-2-(2-penten-1-yl)-3-oxocyclopentenyl acetate in the essential oil of *Tunisian rosemary*. C. r. Acad. Sci. Ser. 264: 2074-2076.
- Creelman R. y Mullet J. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4114-4119.
- Cyr R. y Palevitz B. 1995 Organization of cortical microtubules in plant cells. Curr. Opin. Cell Biol. 7: 65-71.
- Chapman H.W. 1958 Tuberization in the potato plant. Physiol. Plant. 11: 215-224.
- Chatterton N.J. y Silvius J.E. 1980 Photosynthase partitioning into leaf starch as affected by daily photosynthetic period duration in six species. Physiol. Plant. 49: 141-144.
- Chory J. y Li J. 1997 Gibberellins, brassinosteroids and light-regulated development. Plant Cell and Environ. 20: 801-806.
- Davies P., Bimberg P., Maki S., Brenner M. 1986 Phothoperiod modification of [¹⁴C] gibberellin A₁₂ aldehyde metabolism in shoots of pea, line G2. Plant Physiol. 81: 991-996.
- Delmer D. y Armor Y. 1995 Cellulose bioshyntesis. Plant Cell 7: 987-1000.

- Demole E., Lederer E., Mercier D. 1962 Isolement et determination de la structure du jasmonate de methyle, constituant odorant caracteristique del essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* 45: 675-685.
- Deng R. y Prange R. 1988 Effect of paclobutrazol (PP333) on ¹⁴C-assimilate partitioning in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Hort Science* 23: 155 (abstract).
- Dermastia M., Ravnikar M., Vilhar B., Kovac M. 1994 Increased level of cytokinin ribosides in jasmonic acid-treated potato (*Solanum tuberosum*) stem nodes cultures. *Physiol. Plant.* 92: 241-246.
- Devlin P., Rood S., Somers D., Quail P., Whitelam G. 1992 Photophysiology of elongated internode (*ein*) mutant of *Brassica rapa*. *Plant Physiol.* 100: 1442-1447.
- Dittrich H., Kutchan T., Zenk M. 1992 The jasmonate precursor, 12-oxophytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum hortense* cell cultures. *FEBS Lett.* 309: 33-36.
- Dodds J. 1988 Tissue culture technology: practical application of sophisticated methods. *Amer. Potato J.* 65: 167-180.
- Doughty K., Kiddle G., Pye B., Wallsgrave R., Pickett J. 1995 Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate. *Phytochem.* 38: 347-350.
- Esashi L. 1963 The mechanism of ageing in Begonia. *Sc. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ., D* 14: 38-56.
- Estrada R., Tovar P., Dodds J. 1986 Induction of in vitro tubers in a broad range of genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7: 3-10.
- Ewing E.E. 1995 The rol of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization. In: *Plant Hormones*. Davies P. J. (ed.), Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 689-724.

- Ewing E. E. y Struick P.C. 1992 Tuber formation in potato: Induction, initiation and growth. *Hortic. Rev.* 14: 89-198.
- Ewing E. y Wareing P. 1978 Shoot, stolon and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. *Plant Physiol.* 61: 348-353.
- Farmer E.E. y Ryan C. 1990 Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7713-7716.
- Fey B., Benedetti C., Penfold C., Turner J. 1994 *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6: 751-759.
- Foster K., Miller F., Childs K., Morgan P. 1994 Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* 105: 941-948.
- Franceschi V. y Grimes H. 1991 Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6745-6749.
- Fujino K., Koda Y., Kikuta Y. 1995 Reorientation of cortical microtubules in the subapical region during tuberization in single-node stem segments of potato in culture. *Plant Cell Physiol.* 36: 891-895.
- Fukui H., Koshimizu K., Usuda S., Yamazaki Y. 1977a *Agric. Biol. Chem.* 41: 175-180.
- Fukui H., Koshimizu K., Yamazaki Y., Usuda S. 1977b *Agric. Biol. Chem.* 41: 189-194.
- García-Torres L. y Gómez-Campo C. 1973 In vitro tuberization of potato sprouts as affected by ether and gibberellic acid. *Potato Res.* 16: 73-79.
- Gilmour S., Zeevart J., Schwenen L., Graebe J. 1986 Gibberellin metabolism in cell-free extracts from spinach leaves in relation to photoperiod. *Plant Physiol.* 82: 190-195.

- Graebe J.E. 1987 Gibberellin biosynthesis and control. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 419-465.
- Green P. 1980 Organogenesis. A biophysical view. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 51-82.
- Green P. y Poethig S. 1982 Biophysics of the extension and initiation of plant organs. In: *Developmental Order: Its Origin and regulation.* Subtelny S. and Green P. (eds.), Alan R. Liss, New York, pp 485-509.
- Green P. y Selker J. 1991 Mutual alignments of cell walls, cellulose and cytoskeletons: their role in meristem. In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form.* Lloyd C. (ed.), Academic Press, San Diego, CA, pp 303-322.
- Gregory L. 1956 Some factors for tuberization in the potato plant. *Amer. J. Bot.* 43: 281-288.
- Gross D. y Parthier B. 1994 Novel Natural Substances Acting in Plant Growth Regulation. *Plant Growth Regul.* 13: 93-114.
- Guiñazú M., Abdala G., Tizio R. 1988 Effect of free and conjugated gibberellins on roots of potato cuttings treated with CCC in relation to tuber formation. *J. Plant Physiol.* 132: 725-730.
- Gundlach H., Muller M.J., Kutchan T.M., Zenk M.H. 1992 Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393.
- Gunning B.E.S. y Hardham A.R. 1982 Microtubules. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 651-698.
- Hammes P. y Nel P. 1975 Control mechanisms in the tuberization process. *Potato Res.* 18: 262-272.
- Hannapel D. 1991 Characterization of the early events of potato tuber development. *Physiol. Plant.* 83: 568-573.

- Harris P. 1992 *The Potato Crop. The scientific basis for improvement. Second Edition.* Chapman & Hall, 2-6-Boundary Row, London SE1 8HN.
- Harvey B., Crothers S., Evans N., Selby C. 1991 The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27: 59-64.
- Hedden P. 1983 In vitro metabolism of gibberellins. In: *The biochemistry and physiology of gibberellins.* Crozier A. (ed.), Praeger, New York. Vol 1, pp. 99-150.
- Heineke D., Sonnewald U., Bussis D., Gunter G., Leidreiter K., Wilke I., Raschke K., Willmitzer L., Heldt H.W. 1992 Apoplastic expression of yeast-derived invertase in potato. Effects on photosynthesis, leaf solute composition, water relations and tuber composition. *Plant Physiol.* 100: 301-308.
- Helder H., Miersch O., Vreugdenhil D., Sembdner G. 1993 Occurrence of hydroxylated jasmonic acids in leaflets of *Solanum demissum* plants grown under long and short-day conditions. *Physiol. Plant.* 88: 647-653.
- Hendricks T., Vreugdenhil D., Stiekema W. 1991 Patatin and four serine proteinase inhibitor genes are differentially expressed during potato tuber development. *Plant Mol. Biol.* 17: 385-394.
- Hussey G. y Stacey N. 1981 In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 48: 787-796.
- Hussey G. y Stacey N.J. 1984 Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 53: 565-578.
- Jackson S. y Pratt S. 1996 Control of tuberization in potato by gibberellins and phytochrome B. *Physiol. Plant.* 98: 407-412.
- Jackson S. y Willmitzer L. 1994 Jasmonic acid spraying does not induce tuberization in short-day-requiring potato species kept in non-inducing conditions. *Planta* 194: 155-159.

- Jones G., Horgan R., Hall M. 1988 Endogenous gibberellins in the potato, *Solanum tuberosum*. *Phytochem.* 27: 7-10.
- Jones R. y Philips I. 1966 Organs of gibberellins synthesis in light grown sunflower plants. *Plant Physiol.* 41: 1381-1386.
- Kehlen A. 1991 Untersuchungen zum Metabolismus von Jasmonsäure. Ph.D. thesis, Universität Halle.
- Kim Y. 1982 In vitro tuber formation from proliferated shoots of potato (*Solanum tuberosum*) as a method of aseptic maintenance. Ph. D. Thesis. South Korea.
- Koda Y. 1992 The role of Jasmonic Acid and Related Compounds in the Regulation of Plant Development. *International Rev. of Cytology.* Vol 135: 155-199.
- Koda Y. 1997 Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol. Plant.* 100: 639-646.
- Koda Y. y Okazawa Y. 1983a Influences of environmental, hormonal and nutritional factors on potato tuberization in vitro. *Jpn J. Crop Sci.* 52: 582-591.
- Koda Y. y Okazawa Y. 1983b Characteristic changes in the levels of endogenous plant hormones in relation to the onset of potato tuberization. *Jpn J. Crop Sci.* 52: 592-597.
- Koda Y. y Okazawa Y. 1988 Detection of potato tuber-inducing activity in potato leaves and old tubers. *Plant Cell Physiol.* 29 (6): 969-974.
- Koda Y. y Kikuta Y. 1991 Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of Yam plants. *Plant Cell Physiol.* 32 (5): 629-633.
- Koda Y., Omer E.A., Yoshihara T., Shibata H., Sakamura S., Okazawa Y. 1988 Isolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves. *Plant Cell Physiol.* 29 (6): 1047-1051.

- Koda Y., Kikuta Y., Tazaki H., Tsujino Y., Sakamura S., Yoshihara T. 1991a Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochem.* 30: 1435-1438.
- Koda Y., Yoshida K., Kikuta Y. 1991b Evidence for the involvement of jasmonic acid in the control of the stem-growth habit of soybean plants. *Physiol. Plant.* 83: 22-26.
- Koda Y., Takahashi K., Kikuta Y., Greulich F., Toshima H., Ichihara A. 1996 Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. *Phytochem.* 41: 93-96.
- Koshimmizu K., Fukui H., Usuda S., Mitsui T. 1973 Plant growth inhibitors in seeds of pumpkin. In: *Plant Growth Substances*. Hirokawa, Tokyo., pp. 86-92.
- Krummm T. y Boland W. 1996 Leucine and isoleucine conjugates of 1-oxo-2,3-dihydro-indene-4-carboxylic acid: Mimics of jasmonate type signals and the phytotoxin coronatine. *Molecules* 1: 23-26.
- Labavich J. 1981 Cell wall turnover in plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 385-406.
- Levy D., Seabrook J., Coleman S. 1993 Enhancement of tuberization of axillary shoot buds of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 44: 381-386.
- Lindsey K. 1992 *Plant tissue culture manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- López-Delgado H. y Scott I. 1997 Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *J. Plant Physiol.* 151: 74-78.
- López-Juez E., Kobayashi M., Sakurai A., Kamiya Y., Kendrick R. 1995 Phytocrome, gibberellins and hypocotyl growth. *Plant Physiol.* 107: 131-140.

- Lorenzen J.H. y Ewing E.E. 1990 Changes in tuberization and assimilate partitioning in potato (*Solanum tuberosum* L.) during the first 18 days of photoperiod treatment. *Ann. Bot.* 66: 457-464.
- Mac Millan J. y Takahashi N. 1968 Proposed procedure for the allocation of trivial names to the gibberellins. *Nature* 217: 170-171.
- Mac Millan J. 1988 Metabolism of gibberellins A₂₀ and A₉ in plants: Pathways and enzymology. In: Plant growth substances. Pharis RP y Rood SB (eds). Berlin: Springer-Verlag.
- Machácková Y., Sergeeva L., Ondrej M., Zaltsmann O., Konstantinova T., Golyanovskaya S., Eder J., Ovesná J., Rakitin Y., Aksenova N. 1997 Growth pattern, tuber formation and hormonal balance in *in vitro* potato plants carrying *ipt* gene. *Plant Growth Regul.* 21: 27-36.
- MacIntosh G., Ulloa R., Raíces M., Téllez-Iñón M. 1996. Changes in Calcium-Dependent Protein Kinase Activity during *in vitro* Tuberization in Potato. *Plant Physiol.* 112: 1541-1550.
- Makronosov A. y Lundina T. 1959 On the rol of light and dark periods in the photoperiodic reaction of potato. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 127: 924-927.
- Mangat B., Kerson G., Wallace D. 1984 The effect of 2,4-D on tuberization and starch content of potato tubers produced on stem segments cultured *in vitro*. *Am. Potato J.* 61: 355-361.
- Marinus J. 1990 *In vitro* tuberization of four potato cultivars under various daylengths and lightintensities. EAPR, 11th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, 8-13th July, Edinburgh, UK, 107-108. Abstract.
- Mason H., De Wald D., Creelman R., Mullet J. 1992 Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expresion by methyl jasmonate and soluble sugars. *Plant Physiol.* 98: 859-867.

- Matsuki T., Tazaki H., Fujimori T., Hogetsu T. 1992 The influences of jasmonic acid methyl ester on microtubules in potato cells and formation of potato tubers. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (8): 1329–1330.
- Matsura H, Yoshihara T., Ichihara A., Kikuta Y., Koda Y. 1993 Tuber forming substances in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Biosci. Biochem.* 57: 1253-1256.
- Menzel B.M. 1981 Tuberization in potato at high temperatures: promotion by disbudding. *Ann. Bot.* 47: 727-733.
- Meyer A., Gross D., Vorkefeld S., Kummer M., Schmidt J., Sembdner G., Schreiber K. 1989 Metabolism of the plant growth regulator dihydrojasmonic acid in barley shoots. *Phytochem.* 28: 1007-1011.
- Meyer A., Schmidt J., Gross D., Jensen S., Rudolph A., Vorkefeld S., Sembdner G. 1991b Amino acid conjugates as metabolites of the plant growth regulator dihydrojasmonic acid in barley (*Hordeum vulgare*). *J. Plant Growth Regul.* 10: 17-25.
- Meyer A., Gross D., Schmidt J., Jensen E., Vorkefeld S., Sembdner G. 1991a Curcubic Acid Related Metabolites of the Plant Growth Dihydrojasmonic Acid in Barley (*Hordeum vulgare*). *J. Plant Growth Regul.* 187: 401-408.
- Meyer A., Miersch O., Buttner C., Dathe W., Sembdner G. 1984 Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regul.* 3: 1-8.
- Miersch O., Brückner B., Schmidt J., Sembdner G. 1992 Cyclopentane fatty acids from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochem.* 31: 3835-3837.
- Miersch O., Günther T., Fritsche W., Sembdner G. 1993 Jasmonates from different fungal species. *Nat. Prod. Lett.* 2 (4): 293-299.
- Miersch O., Meyer A., Vorkefeld S., Sembdner G. 1986 Occurrence of (+)-7-iso-jasmonic acid in *Vicia faba* L. and its biological activity. *J. Plant Growth Regul.* 5: 91-100.

- Miersch O., Preiss A., Sembdner G., Schreiber K. 1987 (+)-7- iso-jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochem.* 26: 1037-1039.
- Miersch O., Sembdner G., Schreiber K. 1989 Jasmonic acid-like substances from the culture filtrate of *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochem.* 28: 339-340.
- Mizukami H., Tabira Y., Ellis B.. 1993 Methyl jasmonate-induced rosmarinic and biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 12: 706-709.
- Montague M. 1995 Gibberellic acid promotes growth and cell wall synthesis in *Avena* internodes regardless of orientation of cell expansion. *Physiol. Plant.* 94: 7-18.
- Morel G. 1948 Reccherches sur la cultures associée du parasites obligatoires de tissus vaegetaux. *Ann. Epiphyt.* 14: 123-235.
- Murashige T. y Skoog F. 1962 A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 472-497.
- Nishijima T., Katsura N., Koshioka M., Yamazaki H., Mander L. 1997 Effects of uniconazole and GA₃ on cold-induced stem elongation and flowering of *Raphanus sativus* L. *Plant Growth Regul.* 21: 207-214.
- Nitsch J.P. 1951 Growth and development in vitro of excised ovaries. *Am. J. Bot.* 38: 566-578.
- Nojiri H., H. Yamane, H. Seto, I. Yamaguchi, N. Murofushi, T. Yoshihara y H. Shibaoka. 1992 Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonic acid in bulbing and non-bulbing onion plants. *Plant Cell Physiol.* 33 (8): 1225-1231.
- Okasawa Y. 1960 Studies on the relation between the tuber formation of potato plant and its natural gibberellin content. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 29: 121-124.

- Okasawa Y. 1967 Physiological studies on the tuberization of potato plants. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 55: 267-336.
- Olsen J., Jensen E., Junttila O., Moritz T. 1995 Photoperiodic control of endogenous gibberellins in seedlings of *Salix pentandra*. *Physiol. Plant.* 93: 639-644.
- Oparka K.J. 1986 Phloem unloading in the potato tuber, pathways and sites of ATPase. *Protoplasma* 131: 201-210.
- Palmer C.E. y Barker W.G. 1973 Influence of ethylene and kinetin on tuberization and enzyme activity in *Solanum tuberosum* L. stolons cultured *in vitro*. *Ann. Bot.* 37: 85-93.
- Palmer C.E. y Smith O.E. 1969 Effect of abscisic acid on elongation and kinetin-induced tuberization of isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell Physiol.* 10: 657-64.
- Park W.D. 1990 Molecular Approaches to tuberization in potato. In: The molecular and cellular biology of the potato, pp. 43-56, Vayda M.E., Park W.D., eds. C.A.B. International, Redwood Press Ltd., Melksham, UK.
- Park T. y Polacco J. 1989 Distinct lipoxygenase species appear in hypocotyl/radicle of germinating soybean. *Plant Physiol.* 90: 285-290.
- Pelacho A.M. y Mingo-Castel A.M. 1991 Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 97: 1253-1255.
- Pelacho A. M., Martín-Closas L., Campabadal C., Torres A., Farran Y., Mingo-Castel A. 1994 *In vitro* tuberization of potato: Effect of several morphogenic regulators in light and darkness. *J. Plant Physiol.* 144: 705-709.
- Peterson R. L. y Barker W.G. 1979 Early tuber development from explanted stolon nodes of *Solanum tuberosum* var. Kennebec. *Bot. Gaz.*, 140: 398-406.

- Pharis R. y Reid D. 1985 Hormonal regulation of development .III. Role of enviromental factors. *Encycl. Plant Physiol. New Ser, Vol 11*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Phillips I. y Jones R. 1964 Gibberellin-like activity in bleeding sap of root system of *Helianthus annuus* detected by a new dwarf pea epicotyl assay and other methods. *Planta* 63: 269-278.
- Phynney B.O. 1985 Gibberellin A₁, dwarfism and shoot elongation in higher plants. *Biol. Plant.* 27: 47-53.
- Pont-Lezica R.F. 1970 Evolution des substances de type gibbérellines chez la pomme de terre pedant la tubérisation, en relation avec la longueur du jour et la temperature. *Potato Res.* 13: 323-331.
- Racca R. y Tizio R. 1968 A preliminary study of changes in the content of gibberellin-like sustances in the potato plant in relation to the tuberization mechanism. *Eur. Potato J.* 11: 213-220.
- Railton, T.D. y Wareing P.F. 1973 Effects of daylength on endogenous gibberellins in leaves of *Solanum andigena* L.. Changes in levels of free acidic gibberellin-like substances. *Physiol. Plant.* 28: 88-94.
- Ranalli P., Bassi F., Ruaro G., Del Re P., Di Candilo M., Mandolino G. 1994 Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Res.* 37: 383-391.
- Ravnikar M. y Gogala N. 1990. Regulation of potato meristem development by jasmonic acid in vitro. *J. Plant Growth Regul.* 9: 233-236.
- Ravnikar M., Gogala N., Benedicic D., Rode J. 1990 The regulation of organogenesis with jasmonic acid. *Acta Hort.* 280: 169-172.
- Ravnikar M., Vilhar B., Gogala N. 1992 Stimulatory effects of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *J. Plant Growth Regul.* 11: 29-33.

- Rieman G. 1962 Superior: a new white, medium-maturing, scab resistant potato variety with high chipping quality. *Am. Potato J.* 39:19-28.
- Sanchez-Serrano J.J., Amati S., Keil M., Peña-Cortes H., Prat S., Recknagel C., Willmitzer L. 1990 Promoter elements and hormonal regulation of proteinase inhibitor II gene expression in potato. In: *The molecular and cellular biology of the potato*, Vayda M.E. y Park W.D. (eds.). C.A.B. International, Redwood Press Ltd., Melksham, UK. pp. 57-70,
- Schmidt J., Kramell R., Brückner C., Sembdner G., Schreiber K., Stach J., Jensen E. 1990 Gas chromatographic/mass spectrometric and tandem mass spectrometric investigations of synthetic amino acid conjugates of jasmonic acid and endogenously occurring related compounds from *Vicia faba* L. *Biomed. Environm. Mass Spectrom.* 19: 327-338.
- Schneider G., Sembdner G., Jensen E., Bernhard U., Wagenbreth D. 1992 GC-MS identification of native gibberellin-o-glucosides in pea seeds. *Plant Growth Regul.* 11: 15-18.
- Sembdner G., Hermann G., Schliemann W. 1989 Growth: gibberellins, cytokinins, jasmonic acid. *Progr. Bot.* 51: 134-164.
- Sembdner G., Meyer A., Miersch O., Brückner C. 1990 Metabolism of jasmonic acid. In: *Plant Growth Substances*, Pharis R.P. and Rood S.B. (eds.). Springer-Verlag, pp. 374-379.
- Sembdner G. y Parthier B. 1993 The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 44: 569-589.
- Sembdner G., Rainer A., Schneider G. 1994 Plant hormone conjugation. *Plant Mol. Biol.* 26: 1459-1481.
- Shibaoka H. 1994 Plant hormones-induced changes in the orientation of cortical microtubules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 45: 527-544.
- Simko I. 1991 In vitro potato tuberization after the treatment with paclobutrazol. *Biologia* 46: 251-256.

- Simko I. 1993 Effects of kinetin, paclobutrazol and their interactions on the microtuberization of potato stem segments cultured *in vitro* in the light. *Plant Growth Regul.* 12: 23-27.
- Slimmon T., Souza Machado V., Coffin R. 1989 The effect of light on *in vitro* microtuberization of potato cultivars. *Am. Potato J.* 66: 843-848.
- Smith O.E. y Rappaport L. 1969 Gibberellins, inhibitors, and tuber formation in the potato, *Solanum tuberosum*. *Am. Potato J.* 46: 185-191.
- Smith O.E. y Palmer C.E. 1970 Cytokinin-induced tuber formation on stolon of *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 23: 599-606.
- Sponcel V.M. 1995 The Biosynthesis and Metabolism of Gibberellins in Higher Plants. In: *Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology*. 2nd edition. P. J. Davies (ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 66-97.
- Staswick P. E. 1992 Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol.* 99: 804-807.
- Steinitz B., Cohen A., Golldberg Z., Kochba M. 1991 Precocious gladiolus corm formation in liquid shake culture. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 26: 63-70.
- Stoddart J. 1976 Phytochrome and gibberellins. *Nature* 261: 454-455.
- Surrey K. 1967 Action and interaction of red and far-red irradiation on lipoxidase metabolism of squash seedlings. *Plant Physiol.* 44: 421-424.
- Taiz L. 1984 Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 585-675.
- Takahashi K., Fujino K., Kikuta Y., Koda Y. 1994 Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 100: 3-8.

- Takahashi K., Fujino K., Kikuta Y., Koda Y. 1995 Involvement of the accumulation of sucrose and the synthesis of cell wall polysaccharides in the expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 111: 11-18.
- Takahashi N., Yamaguchi Y., Yamane H. 1986 Gibberellins. In: *Chemistry of Plant Hormones*. N. Takahashi Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp 57-151.
- Talón M. 1993 Giberelinas. En: Azcón-Bieto J. y M. Talón (eds). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. pp. 301-318. Hill-Interamericana, Barcelona.
- Titarenko E., Rojo E., León J., Serrano J. 1997 JA-dependent and independent signalling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115: 817-826.
- Tizio R. 1964a Action de l'acide gibbérellique sur la tubérisation de la pomme de terre. *Cr. Acad. Sc. Paris* 259: 1187-1190.
- Tizio R. 1964b Effect du system racinaire sur la tubérisation de la pomme de terre. *Cr. Acad. Sc. Paris* 258: 6503-6506.
- Tizio R. 1964c Nouvelles recherches sur l'action qu'exerce le systé-racinaire sur la tuberisation de la pomme de terre. *Cr. Acad. Sc. Paris* 259: 428-431.
- Tizio R. 1966 Interaction du facteur racinaire et de l'acide gibbérellique sur la croissance des stolons et la tubérisation de la pomme de terre. *Cr. Acad. Sc. Paris* 262: 767-770.
- Tizio R. 1969 Action du CCC [Chlorure de (2- cloroethyl) trimethylammonium] sur la tubérisation de la pomme de terre. *Eur. Potato J.* 12: 3-7.
- Tizio R. 1971 Action et rôle probable de certaines gibbérellines (A₁, A₃, A₄, A₅, A₇, A₉ et A₁₃) sur la tubérisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res.* 14: 193-204.
- Tizio R. 1979 Contribution a l'étude du mécanisme hormonal de tubérisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) Thèse Doct Etat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.

- Tizio R. y Golenioswki M. 1985 Nouvelles recherches sur la nature gibbérellinique du "facteur radicaire" qui retarde la tubérisation de germes de pomme de terre cultivés in vitro. Cr Acad Sc Paris 300 Serie III13: 499-502.
- Tovar P., Estrada R., Schilde-Rentschler L., Dodds J. 1985 Inducción y utilización de tubérculos in vitro de papa. CIP 13(4): 1-5.
- Trippi V.S. 1982 Ontogenia y Senilidad en Plantas. Universidad Nacional de Córdoba. Dirección General de Publicaciones. Córdoba. Argentina.
- Ueda J. y Kato J. 1982. Inhibition of cytokinin- induced plant growth by jasmonic acid and its metyl ester. *Physiol. Plant.* 54: 249-252.
- Ueda J., Miyamoto K., Aoki M. 1995. Jasmonic acid inhibits the IAA induced elongation of oat coleoptile segments: A possible mechanism involving the metabolism of cell wall polysaccharides. *Plant Cell Physiol.* 35: 1065-1070.
- Van der Berg J.H., Davies P.J., Ewing E.E., Halinska A. 1994a Gibberellin metabolism in *Solanum tuberosum* ssp. andigena. In: Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology. 2nd edition. P. J. Davies (ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 698-724.
- Van der Berg J.H., Davies P.J., Ewing E.E., Halinska A. 1994b Gibberellin metabolism and morphology of dwarf and wild type *Solanum tuberosum* ssp. andigena grown under long and short photoperiods. In: Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology. 2nd edition. P. J. Davies (ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 698-724.
- Vick B.A. y Zimmerman D.C. 1984 Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 75: 458-461.
- Vick B.A. y Zimmerman D.C. 1987 Oxidative systems for the modification of fatty acids. IN: The Biochemistry of Plants, Lipids. Stumpf P. y Conn E. (eds.). Academic, New York, vol 9, pp. 53-90.
- Vince-Prue D. 1985 Photoperiod and hormones. In: Hormonal regulation of development .III. Role of environmental factors. *Encycl. Plant Physiol.* Pharis R.

- and D. Reid (eds.). New Ser, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, Vol 11, pp 308-364.
- Voskresenkaya N. 1979 Photoregulatory aspects of plant metabolism (In Russian). Nauka, Moscow.
- Vreugdenhil D. y Helder H. 1991 Hormonal and metabolic control of tuber formation. Progress in Plant Growth Regulation. Proceedings of the 14th Int. Conf. on PGR. Amsterdam.
- Vreugdenhil D. y Struiik P. 1989 An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiol. Plant.* 75: 525-531.
- Vreugdenhil D., Bindels P., Reinhoud P., Klocek J., Hendriks T. 1994 Use of the growth retardant tetacyclacis for potato tuber formation *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 14: 257-265.
- Wang P. y Hu C. 1982 In vitro mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. *Am. Potato J.* 59: 33-37.
- Wang P. y Hu C. 1985 Potato tissue culture and its application in agriculture. In: *Potato Physiology*. Li P.H. (ed.). Academic Press, Inc, Orlando. pp. 504-577.
- Wasternack C. y Parthier B. 1997 Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science.* 2 (8): 302-307.
- Weller J., Ross J., Reid J. 1994 Gibberellins and phytochrome regulation of stem elongation in pea. *Planta* 192: 489-496.
- White P.R. 1943 A handbook of plant tissue cultures. Lancaster, Pa., The Jacques Cattell Press.
- Williamson R. 1991 Orientation of cortical microtubules in interphase plant cell. *Int. Rev. Cytol.* 129: 135-206.
- Woolley D.J. y Wareing P.F. 1972 Enviromental effects on endogenous cytokinins and gibberellin levels in *Solanum tuberosum*. *New Phytol.* 71: 1015-1025.

- Xia Z.Q. y Zenk M.H. 1993 A new metabolite of the plant growth regulator jasmonic acid. Poster, 18th IUPAC Symposium Chemical and Natural Products, Strassbourg.
- Xu Y., Chang P.F., Liu D., Narasimhan M.L., Raghothama K.G., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1994 Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6:1077-1085.
- Yoshihara T., Amanuma M., Tsutsumi T., Okumura Y., Matsuura H., Ichihara A. 1996a Metabolism and transport of [2-¹⁴C]±jasmonic acid in the potato plant. *Plant Cell Physiol.* 37: 586-590.
- Yoshihara T., Ohmori F., Ichihara A. 1996b Metabolism and transport of [2-¹⁴C]±jasmonic acid under the different photoperiod. *Plant Cell Physiol.* 37: (Suppl): 9.
- Yoshihara T., Matsuura H., Ichihara A., Kikuta Y., Koda Y. 1992 Tuber forming substances of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). In: Progress in Plant Growth Regulation, Eds. Karszen, Van Loon, Vreugdenhil. pp. 286-290.
- Yoshihara T., Omer E.A., Koshino H., Sakamura S., Kikuta Y., Koda Y. 1989 Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agric. Biol. Chem.* 53: 2835-2837.
- Zeevaart J.A.D. y Gage D.A. 1993 ent-Kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants *Spinacia oleracea* L. and *Agrostemma githago* L. *Plant Physiol.* 101: 25-29.
- Zimmerman R.H., Debergh P. (eds) 1990. Micropropagation. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht.

