

64415

T.486



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICO-QUIMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES
LABORATORIO DE FISIOLÓGIA VEGETAL

*"Ácido jasmónico, Abscísico y sus metabolitos en las respuestas
a estrés abiótico de un cultivar silvestre y mutantes de tomate
hipersensibles "*

Tesis Doctoral
Lic. Andrea Mariela Andrade

Noviembre 2007



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES
LABORATORIO DE FISIOLÓGIA VEGETAL

"Ácido jasmónico, Abscísico y sus metabolitos en las respuestas
a estrés abiótico de un cultivar silvestre y mutantes de tomate
hipersensibles "

Tesis Doctoral
Lic. Andrea Mariela Andrade

Noviembre 2007

ANDRADE, A.M
Acido Jasmónico, Abs




2007 64415

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora: Dra. Guillermina Abdala

Co-director: Dr. Sergio Alemano

Aprobado por el Tribunal de Tesis:


.....
Dra. M. Virginia Luna

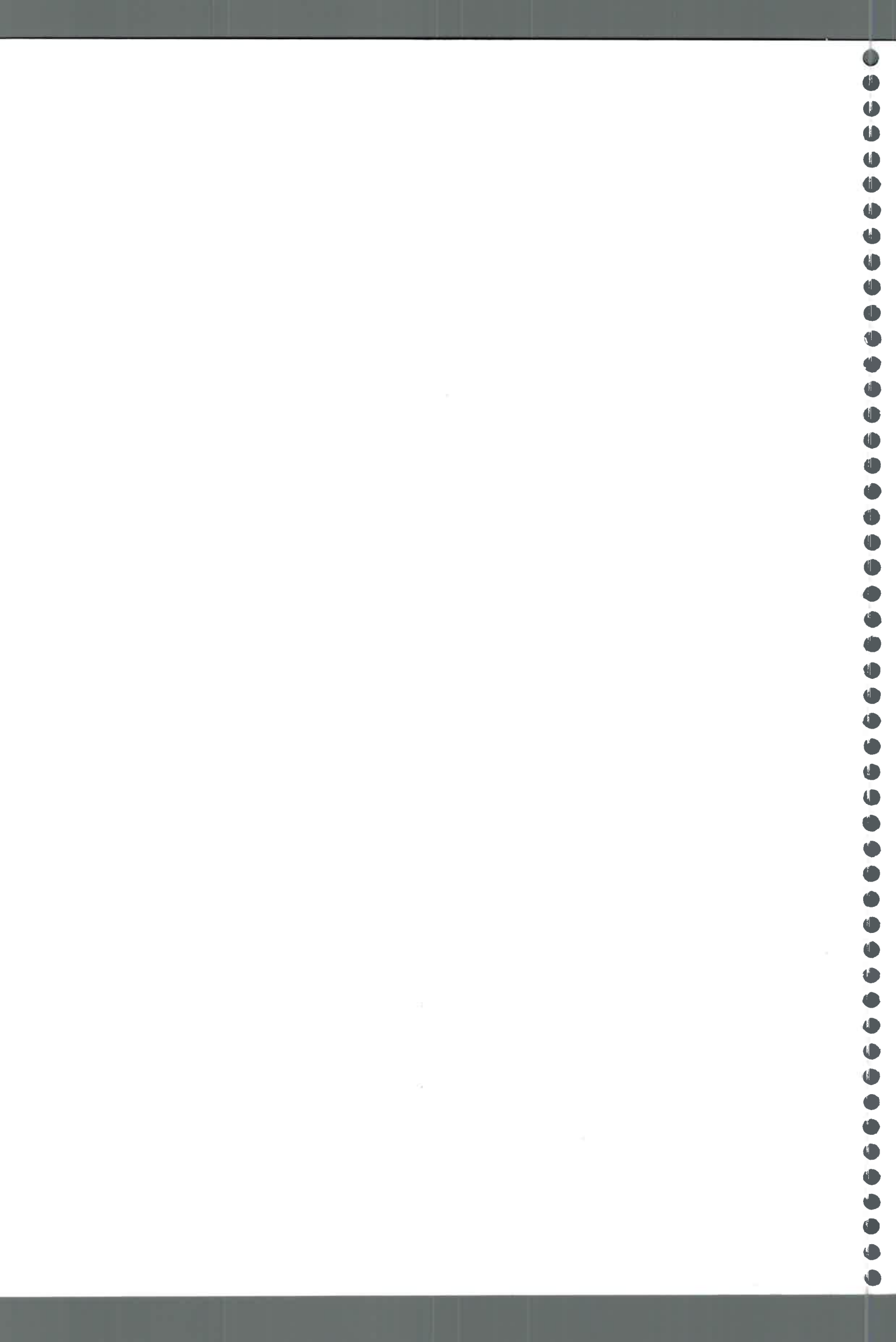

.....
Dra. Graciela Racagni


.....
Ing. Eligio Morandi

64415

MFN:
Clasif: T.4186

*A mamá
Con mucho amor.....*



Agradecimientos

A Guille, por brindarme la posibilidad de continuar mi formación profesional bajo su dirección, facilitando todo cuanto estuvo a su alcance. Por apoyarme y alentarme ante cada bajón durante todos estos años...y también por confiar en mí y perdonar mis desaciertos y “metidas de pata”.

A Sergio, como siempre por su ayuda incondicional, optimismo y buena predisposición. Por estar siempre para darme una mano con gráficos, papers...etc..Y también por escucharme, aconsejarme y compartir largas tardes de trabajo.

A Ana Vigliocco, por su paciencia a la hora de enseñarme la técnica de extracción de jasmónico.... y del análisis estadístico!!! Gracias por brindarme tu amistad y consejos, y por las charlas compartidas en nuestra mesa de trabajo. Por ayudarme y socorrerme con la compu y algún que otro paper y datos “extraviados”.

A Gaby y Ana C. por su compañerismo, aliento y por compartir ratos de mate...y otras “yerbas”.

A Oscar, por su paciencia infinita, sus enseñanzas sobre ABA y poner a punto la técnica de extracción de metabolitos. Su predisposición a responder a todas mis preguntas (que fueron muchas, por cierto) y ayudarme con la interpretación de los resultados.

Al Dr. Otto Miersch, quien contribuyó a una parte importante de esta tesis al permitirme cuantificar jasmonatos en su laboratorio. Por la hospitalidad y cariños brindados durante mi estadía.

A los miembros del jurado de esta Tesis Doctoral, por su asesoramiento y aportes críticos al trabajo. Un agradecimiento muy especial a Virginia, quien me enseñó la técnica de extracción de ABA, me ayudó con los resultados y compartió conmigo las interminables horas de trabajo en la redacción del paper.

A mis padres, especialmente a mamá por su ejemplo de optimismo, por su contención y estímulo ante mis reiterados y típicos bajones. Porque confiaste en mí y creíste que esto era importante.

A mi hermano, por su "forma de estar".....un poco ausente, siempre metido en sus cosas, pero siempre al tanto de lo que me pasaba, alentándome y brindándome su cariño.

A Benjamín, por compartir su vida conmigo y bancarse otra carrera a mi lado. Gracias por soportar mis ausencias.....y esperarme.

A Dios, por darme la voluntad y las fuerzas para afrontar cada día de mi vida.

Al Instituto San Juan de la Cruz y su directora por haberme otorgado las licencias oportunas que hicieron posible mis viajes, y en esta oportunidad por los días concedidos para preparar la tesis.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitir mi formación de postgrado y a todo el personal del departamento de Ciencias Naturales por haber colaborado, de una u otra manera, en la concreción de este trabajo.



Prefacio

Hace aproximadamente cien años que el botánico alemán Julian von Sachs sugirió que el crecimiento y desarrollo de una planta podría estar controlado por sustancias endógenas específicas. Actualmente conocemos que grupos de compuestos denominados “hormonas” intervienen en diversos procesos bioquímicos y fisiológicos de las plantas. Sin embargo, aún con los protagonistas en la mano las funciones de estas sustancias presentan aspectos oscuros. Por ejemplo, dentro de una planta, una sola hormona puede regular varios procesos y al mismo tiempo diferentes hormonas pueden influenciar un solo proceso. Por lo tanto cabe preguntarse si la flexibilidad de la acción hormonal contribuye a la plasticidad del desarrollo de una planta o es su consecuencia. La complejidad de las respuestas hormonales ha dado lugar a prolongadas especulaciones acerca de la “lógica” de la acción hormonal, pero este debate ha contribuido poco a la comprensión de la biología de las hormonas. La dilucidación de estas complejidades requiere de la identificación de las moléculas que participan como hormonas, de las que median la transducción del mensaje hormonal y por último la respuesta celular que regulan. Es interesante plantearse si diferentes hormonas utilizan moléculas señales similares o bien si diferentes células, tejidos o aún especies de plantas usan todos o sólo algunos de estos compuestos. La aplicación de análisis genéticos ha comenzado a brindar algunas respuestas. Así, la utilización de mutantes con reducida o aumentada sensibilidad a un regulador o factor particular ha permitido avanzar en el conocimiento de la acción hormonal y de su papel controlador de la manera en que las plantas crecen y se desarrollan.

Actualmente, cuando el rol de los genes en la regulación de prácticamente todos los aspectos del crecimiento y desarrollo es considerado de prima importancia, es claro sin embargo que ellos están bajo estricto control hormonal, ya sea vía modificación de los niveles hormonales en respuesta a cambios en la transcripción de genes, o por las mismas hormonas como reguladoras de la transcripción de genes.

En el presente contexto, este trabajo de tesis intenta aportar nuevos conocimientos sobre el rol de las hormonas en relación a factores de estrés, a través del análisis comparativo de su contenido endógeno en un cultivar silvestre de tomate y sus respectivos mutantes sensibles a estrés abiótico. Además, se establecen relaciones entre dos hormonas, ácidos jasmónico y abscísico y sus respectivos derivados en los germoplasmas mencionados. Por último, la evaluación del contenido endógeno hormonal en semillas secas y embebidas así como aplicaciones exógenas prueban su rol regulatorio en la germinación de semillas del cultivar silvestre.

Resumen

En el presente trabajo se investigó la dinámica hormonal de jasmonatos (JAs), ácido abscísico (ABA) y compuestos derivados en un cv. silvestre de tomate y sus mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* con sensibilidad diferencial a estrés abiótico (iónico y osmótico).

En semillas secas, embebidas y plántulas del cv. Moneymaker y mutantes se detectó la presencia de JAs tales como el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido jasmónico (JA), metil-jasmónico (ME-JA) y los derivados hidroxilados 11-hidroxijasmónico (11-OH-JA) y 12-hidroxijasmónico (12-OH-JA). Los compuestos mayoritarios fueron los derivados hidroxilados. En semillas secas del wt, *tss2* y *tos1* 12-OH-JA fue el más abundante. El contenido de los derivados hidroxilados en semillas fue superior al de plántulas.

Con el curso de la imbibición de semillas wt y *tss1* el contenido basal de 11-OH-JA y 12-OH-JA sufrió una importante reducción a las 72 h, momento en que se visualizó la profusión de la radícula. Simultáneamente ocurrió una importante liberación de las formas hidroxiladas hacia el agua de imbibición.

En plántulas se registró una disminución general de JAs, principalmente de ambas formas hidroxiladas y de ME-JA. Bajo estrés salino y osmótico, las plántulas mutantes mostraron diferentes perfiles de JAs de acuerdo a su sensibilidad diferencial a estrés.

En semillas secas y embebidas del wt y mutantes también se detectó la presencia de ABA y sus metabolitos, ácido faseico (PA), ácido dihidrofaseico (DPA) y ABA conjugado con glucosa (ABA-GE).

Las semillas wt y mutantes mostraron diferentes niveles endógenos y patrón metabólico de ABA de acuerdo a su sensibilidad diferencial a estrés. En general, un alto nivel basal de ABA se cuantificó en semillas secas, el cual fue superior en el wt que en los mutantes. El mayor porcentaje de germinación de *tss2* fue coincidente con un contenido mínimo de ABA. Respecto a los metabolitos, DPA fue el más abundante y su concentración fue superior en el wt. PA fue un componente minoritario en todos los germoplasmas y el nivel de ABA-GE fue 2 veces mayor en el wt que en los mutantes.

En semillas embebidas se registraron los mayores niveles de los metabolitos, particularmente DPA. Los mutantes *tss2* y *tos1* presentaron los niveles más altos de DPA, mientras que en *tss1*, mutante sensible a estrés iónico, la oxidación a DPA fue una vía catabólica menos importante. Por lo tanto, la considerable disminución de ABA luego del comienzo de la imbibición sugiere la activación de la ruta catabólica. La variación en los niveles de los metabolitos entre semillas secas y embebidas demostró que el metabolismo de ABA es diferencialmente regulado en los germoplasmas analizados.

En síntesis, el menor contenido hormonal de los mutantes respecto al wt se correlaciona con su sensibilidad a estrés. El contenido hormonal actuaría regulando diferencialmente la capacidad germinativa de cada germoplasma. La mayor abundancia de 12-OH-JA en semillas secas y de DPA en semillas embebidas indica que la vía hidroxilativa fue la predominante para JA y ABA, sugiriendo que podría constituir un mecanismo de inactivación de la señalización de ambas hormonas.

Summary

In the present study it was investigated the hormonal dynamics of jasmonates (JAs), abscisic acid (ABA) and derivative compounds in a cv. wild-type of tomato and their mutants *tss1*, *tss2* and *tos1* with differential sensibility to abiotic stress (ionic and osmotic).

The JA precursor OPDA, JA, and the JA-derivatives 11-OH-JA, 12-OH-JA and JAME were detected in dry and imbibed seeds and seedlings of tomato cv. MoneyMaker (wild-type) and mutants. The main compounds were the hydroxylate-JAs. 12-OH-JA was the most abundant in dry seeds of the wild-type and in *tss2* and *tos1*. The amounts of these derivatives were higher in seeds than in seedlings.

At 72 h of the imbibition course of wild-type and *tss1* seeds, when the profusion of the radicle was visualized, the basal content of 11-OH-JA and 12-OH-JA suffered an important reduction. Simultaneously it was observed an important release of the hydroxylate forms toward the imbibition water.

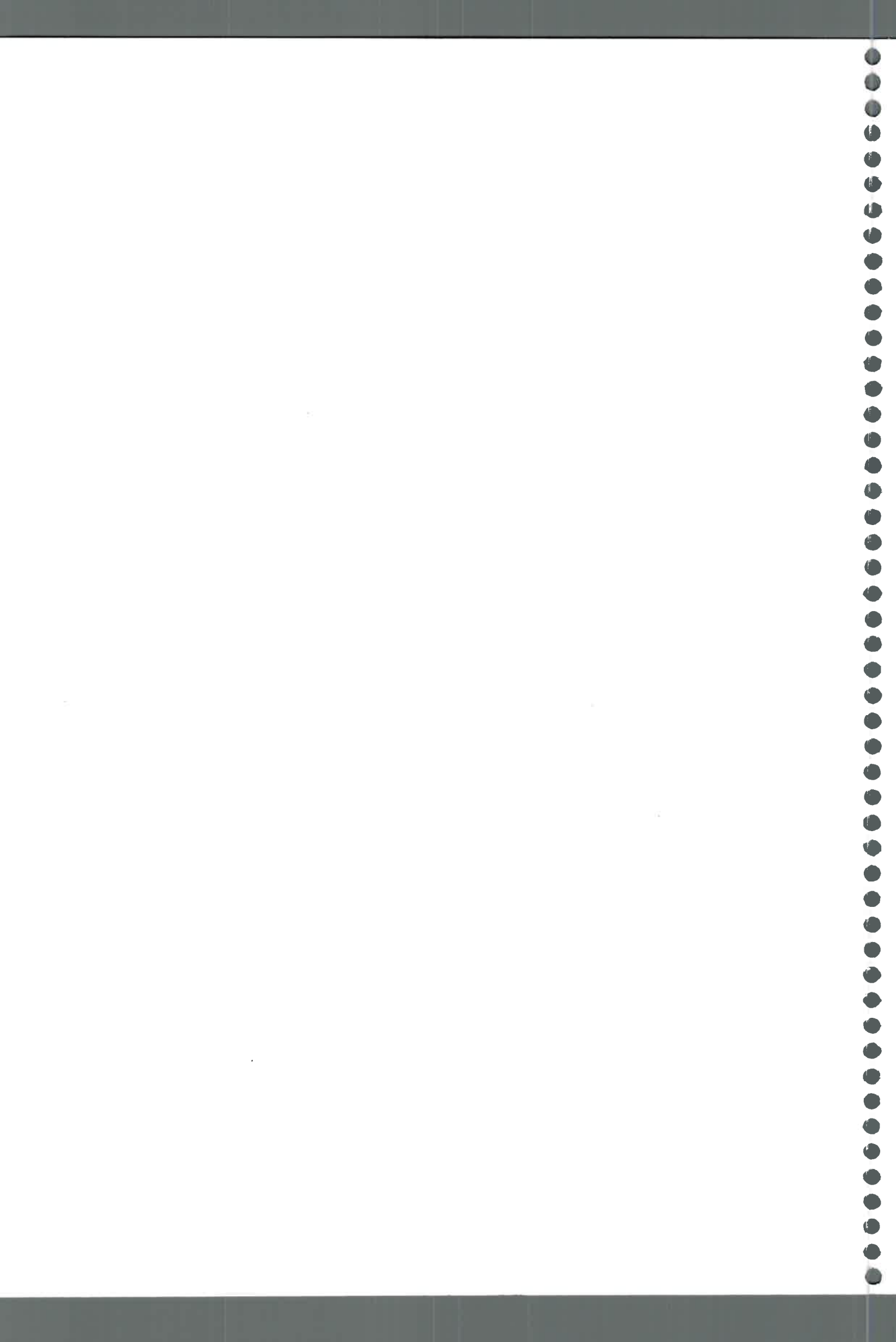
Seedlings showed a general decrease of JAs, mainly in both forms hydroxylate and ME-JA. Under saline and osmotic stress, the mutant seedlings showed different profiles of JAs according to their differential sensibility to stress.

In dry and imbibed wild-type and mutant seeds it was also detected the presence of ABA and its metabolites, such as phaseic acid (PA), dihydrophaseic acid (DPA) and ABA glucose ester (ABA-GE).

Wild-type and mutant seeds showed different ABA endogenous levels and metabolic patterns according to their differential sensibility to stress. In general, dry seeds showed a high basal level of ABA which was higher in the wt than in the mutants. The highest germination percentage of *tss2* was coincident with minimal ABA content. Considering the metabolites, DPA was the most abundant and its concentration was higher in the wild-type seeds. PA was a minor component in all germoplasms, and the level of ABA-GE was 2-fold higher in wt than in the mutants.

The higher levels of ABA metabolites, particularly DPA, were registered in imbibed seeds. The *tss2* and *tos1* mutants presented the highest levels of DPA while in *tss1*, the ionic stress-sensitive mutant, the oxidation to DPA was a less important catabolic pathway. Therefore, the considerable decrease of ABA level following seed imbibition suggests the activation of the catabolic pathway. The variation in levels of metabolites between dry and imbibed seeds demonstrated that ABA metabolism is differentially regulated in the analyzed germoplasms.

Concluding, the low hormonal content in the mutants compared to the wt is correlated with its sensibility to stress. The hormonal content would act differentially regulating the germinative capacity of each germoplasms. The highest content of 12-OH-JA and DPA in dry and imbibed seeds indicates that the hydroxylative pathway was the predominant for JA and ABA, suggesting that it could constitute an inactivation mechanism of the signaling of both hormones.



ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
- Ácido jasmónico y derivados.....	1
- La vía LOX para la biosíntesis de oxilipinas.....	4
- Biosíntesis de JA y localización subcelular de enzimas biosintéticas.....	7
- Funciones de JAs.....	11
- Ácido abscísico y derivados.....	13
- Funciones de ABA.....	15
- Mutantes hipersensibles a estrés abiótico.....	17
 HIPÓTESIS	 19
 OBJETIVOS	 20
- Objetivo General.....	20
- Objetivos Específicos.....	20
 MATERIALES Y MÉTODOS	 21
- Material vegetal.....	21
- Condiciones de imbibición de las semillas.....	21
- Evaluación de la capacidad germinativa.....	21
- Condiciones de crecimiento de las plántulas.....	21
- Análisis estadístico.....	22
- Extracción, purificación y estimación de jasmonatos.....	22
- Mini-columna DEAE-Sephadex A-25.....	23
- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	23
- Derivatización para JA, OPDA, 11-OH-JA y 12-OH-JA.....	24
- Identificación y cuantificación por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa-monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM).....	24
- Extracción, purificación y cuantificación de ME-JA.....	25
- Extracción, purificación y estimación de ABA.....	25
- Mini-columna Amino (NH ₂).....	26
- Extracción y purificación de PA, DPA y ABA-GE.....	26
- Aplicación exógena de jasmonatos y ácido abscísico.....	28

RESULTADOS	29
- Contenido endógeno de jasmonatos en semillas secas.....	29
- Contenido endógeno de jasmonatos en semillas embebidas y agua de imbibición....	32
- Contenido total de hidroxilados en semillas embebidas + agua de imbibición.....	37
- Contenido endógeno de jasmonatos en plántulas controles.....	37
- Contenido endógeno de jasmonatos en semillas secas y plántulas controles.....	38
- Contenido endógeno de jasmonatos en plántulas tratadas con NaCl.....	41
- Contenido endógeno de jasmonatos en plántulas tratadas con manitol.....	44
- Contenido endógeno de ABA y metabolitos en semillas secas.....	46
- Contenido endógeno de ABA en semillas embebidas y agua de imbibición.....	48
- Contenido endógeno de metabolitos de ABA en semillas embebidas.....	50
- Capacidad germinativa de las semillas wt y de los mutantes.....	52
- Aplicación exógena de jasmonatos y ABA en semillas wt.....	54
DISCUSIÓN	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ABREVIATURAS

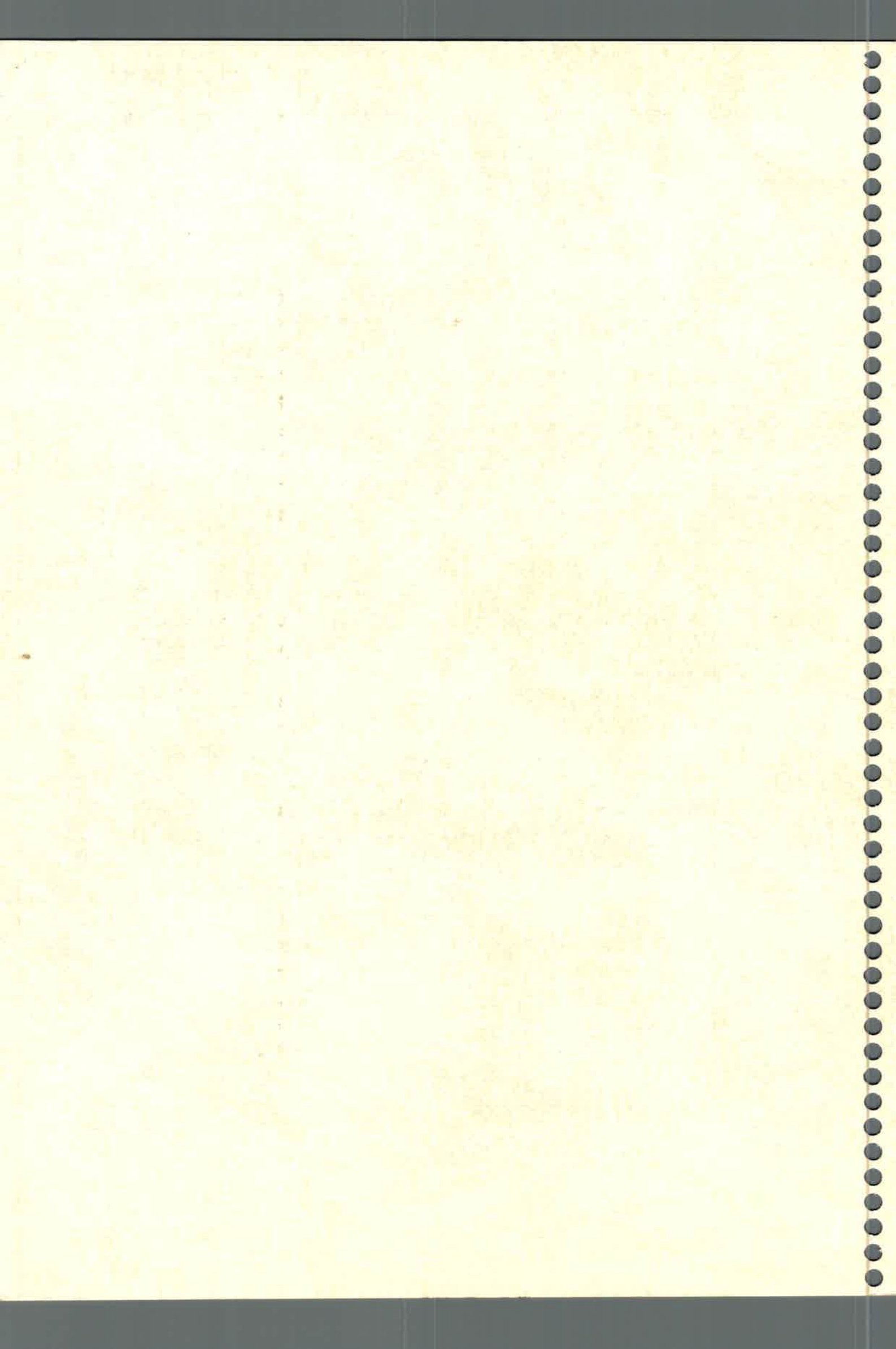
ABREVIATURAS

10-OPDA	Ácido 10- <i>oxo</i> -fitodienoico
11-OH-JA	Ácido jasmónico hidroxilado en C11
12-OH-JA	Ácido jasmónico hidroxilado en C12
13-AOS	<i>13-Óxido de aleno sintasa</i>
13-HPL	<i>13-hidroperóxido liasa</i>
13-HPOT	<i>13- hidroxiperóxido-octadecatrienoico</i>
13-LOX	<i>13-hidroperóxido de ácido graso</i>
16:3	Ácido hexadecatrienoico
18:3	Ácido octadecatrienoico-Ácido linolénico
9-AOS	<i>9-Óxido de aleno sintasa</i>
9-HPOT	<i>9-hidroxiperóxido-octadecatrienoico</i>
9-LOX	<i>9-hidroperóxido de ácido graso</i>
8'-OH-ABA	<i>8-hidroxi-ABA</i>
9'-OH-ABA	<i>9-hidroxi-ABA</i>
ABA	Ácido abscísico
ABA-GE	Éster glucosílico de ABA
AcOH	Ácido acético
AAO	<i>ABA-aldehído oxidasa</i>
ACX	<i>Acil-CoA oxidasa</i>
AOC	<i>Óxido de aleno ciclasa</i>
AOS	<i>Óxido de aleno sintasa</i>
ANNOVA	Análisis de la Varianza
BHT	2, 6-di-tert-butil-p-kresol
BSTFA	N,O-bis (trimetil-silil) trifluoroacetamida
c.c	Capacidad de campo
Cv.	Cultivar
DES	<i>Divinil éter sintasa</i>
Dn-OPDA	Dinor-OPDA o dinor-Ácido octadecanoico
DPA	Ácido dihidrofaseico
Epi-DPA	Ácido <i>epi</i> -dihidrofaseico
GC-MS-SIM	Cromatografía gaseosa-Espectrometría de Masas-Monitoreo selectivo de iones
HF	Cultivar <i>Hellfrucht Fruhstamm</i>
HPL	<i>Hidroperóxido liasa</i>
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
HR	Humedad relativa
JA	Ácido jasmónico
JA-Ile	Ácido jasmónico conjugado con isoleucina
JAs	Jasmonatos
JIPs	Proteínas inducidas por Ácido jasmónico
KAT	<i>L-3-ketoacil-CoA tiolasa</i>
LOX	<i>Lipoxigenasa</i>
Neo-PA	Ácido neo-faseico
NCED	<i>9 cis-epoxicarotenoide dioxigenasa</i>
NaOH	Hidróxido de sodio
ME-JA	Metil jasmónico

Me-OPDA	Ácido 12- <i>oxo</i> -fitodienoico metilado
MeOH	Metanol
<i>MFP</i>	<i>Proteína multifuncional</i>
MGDG	Monogalactosil diacilglicerol
MGDG-O	(12- <i>oxo</i> -fitodienoil)-monogalactosildiglicérido
OGAs	Ácidos oligogalacturónicos
OPC-8:0	Ácido 3- <i>oxo</i> -pentenilo-ciclopentano-octanoico
OPCs	Oxo-pentenil-ciclopentanonas
OPDA	Ácido 12- <i>oxo</i> -fitodienoico
<i>OPRs</i>	<i>OPDA reductasas</i>
P450	Citocromo 450
PA	Ácido faseico
PC	Fosfatidilcolina
PINs	Inhibidores de proteasas
PS	Peso seco
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
rpm	Revoluciones por minuto
Rt	Tiempo de retención
SE	Desvío estándar
<i>Sos</i>	Mutantes <i>salt overly sensitive</i>
<i>Tss</i>	Mutantes <i>tomato salt-sensitive</i>
<i>Tos1</i>	Mutante <i>tomato osmotic hypersensitive</i>
<i>Tss1-2</i>	Mutantes <i>tomato salt hypersensitive</i>
wt	Wild type
α -LA	α -ácido linolénico
ZEP	<i>Zeaxantina epoxidasa</i>



INTRODUCCIÓN





Introducción

Ácido jasmónico y derivados

Las biomembranas son tan antiguas como los organismos vivos y constituyen un elemento clave que separa el contenido celular de su medio ambiente representando un sitio esencial para la percepción y transmisión de señales. Sin embargo, las membranas en sí mismas constituyen una fuente importante de moléculas señales, algunas de las cuales son derivadas de ácidos grasos. Estas moléculas pueden actuar como señales intracelulares, extracelulares o bien como señales para la comunicación entre organismos.

El metabolismo oxidativo de ácidos grasos que se produce en las membranas da lugar a la formación de compuestos biológicamente activos, denominados colectivamente *oxilipinas*. Éstas se sintetizan a partir de ácidos grasos poliinsaturados mediante la oxidación producida por uno, dos o cuatro átomos de oxígeno. Dicha reacción es catalizada por citocromo P450, lipoxigenasas (LOX) y ciclo-oxigenasas, respectivamente. Por lo tanto, la diversidad estructural de las oxilipinas es generada por la acción coordinada de estas tres enzimas.

En plantas y vertebrados existen ciertas analogías entre la biosíntesis y función de las oxilipinas (Fig. 1). En animales, las oxilipinas son producidas principalmente vía ácido araquidónico, un ácido graso de 20C; originando hidroperóxidos, epóxidos, prostaglandinas y tromboxanos. Los últimos compuestos desempeñan una función esencial en procesos antiinflamatorios y en las respuestas a estrés por infección y alergia (Fig. 1 A). En plantas, la síntesis se inicia a partir de ácidos grasos poliinsaturados de 18C los cuales por acción de las enzimas citocromo P450, LOX y ciclo-oxigenasas forman también hidróxidos, hidroperóxidos y aldehídos entre otros (Fig. 1B).

El conocimiento de los procesos que regulan la biosíntesis y localización de estos derivados lipídicos es crucial para la comprensión de la actividad biológica de esta familia de metabolitos. Estudios recientes que incluyen la clonación y caracterización de nuevas actividades catalíticas de enzimas de la biosíntesis de oxilipinas aportan mayores evidencias acerca de tales procesos.



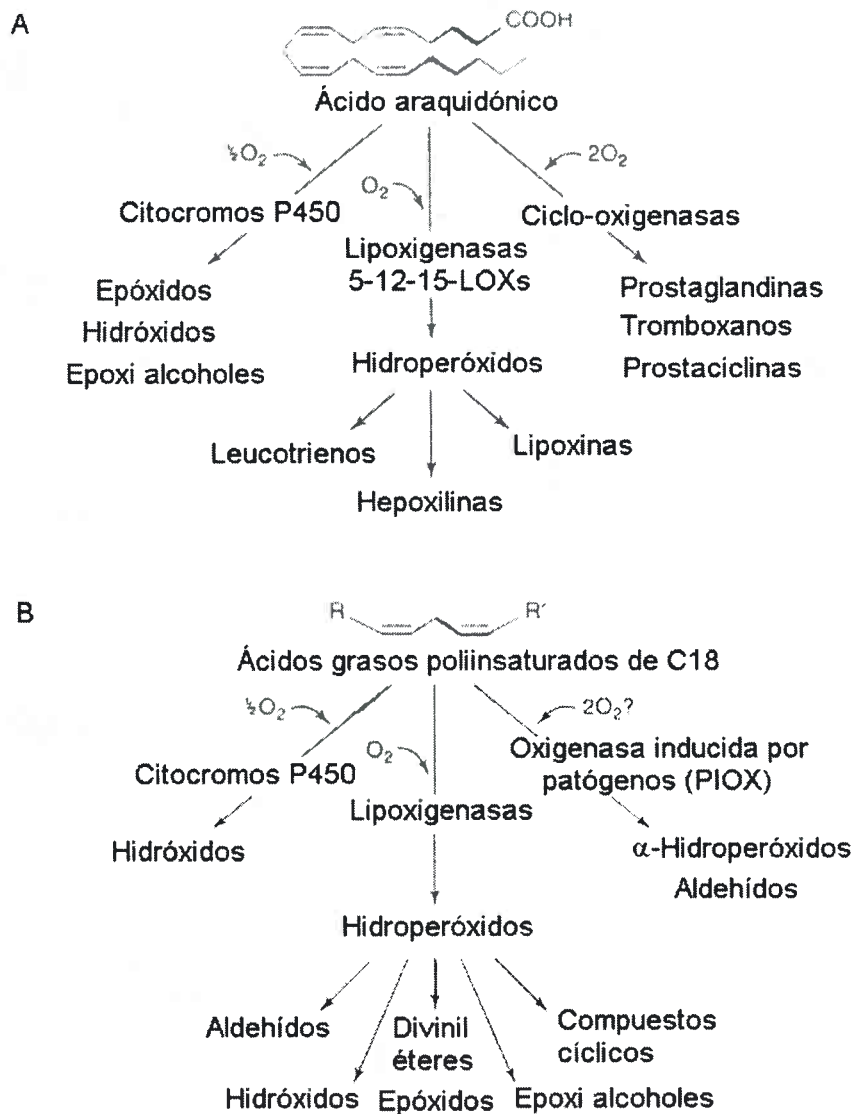
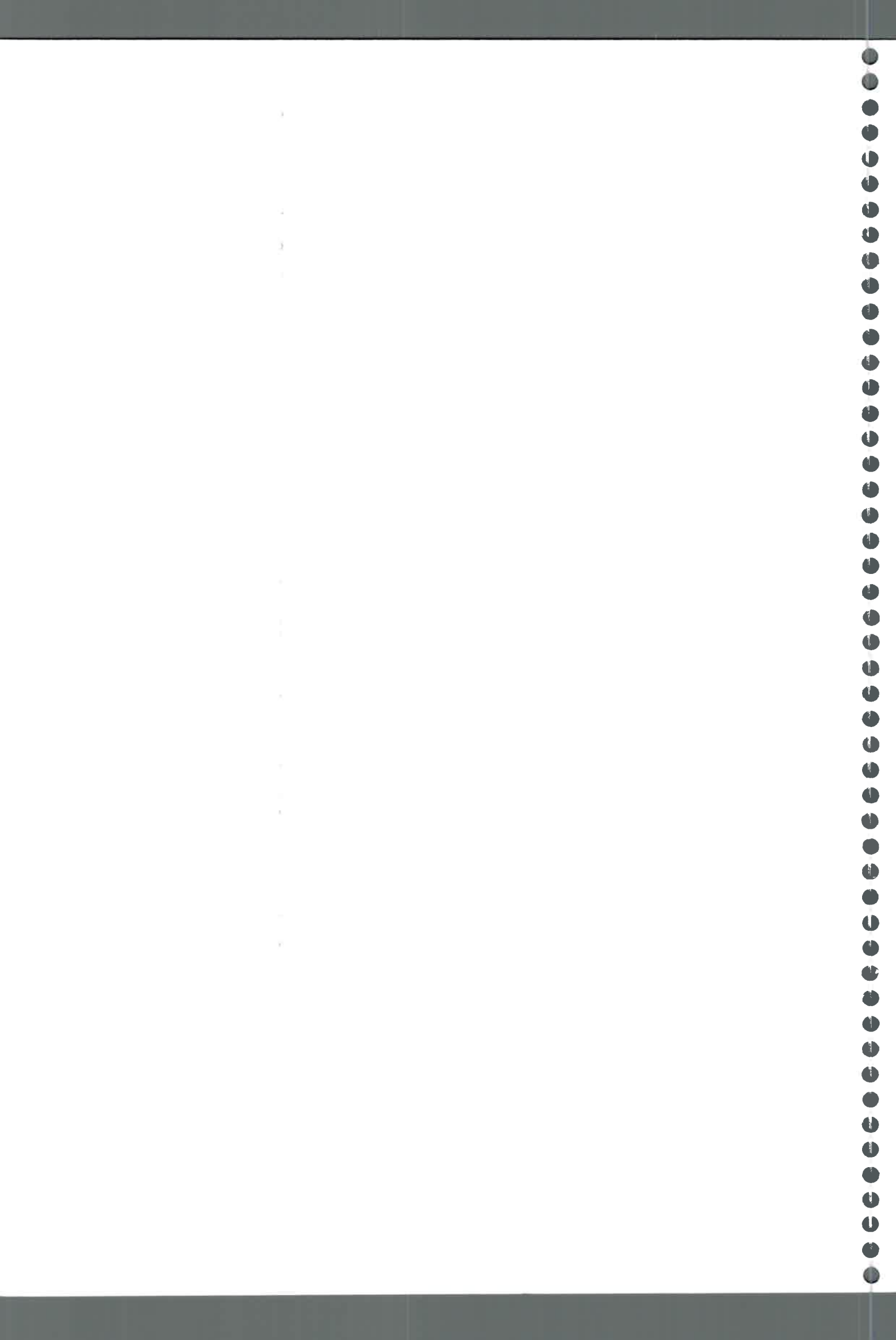


Fig. 1. **A. Biosíntesis y función de las oxilipinas en animales. B. Biosíntesis y función de las oxilipinas en vegetales.** (Adaptado de Blée E, 2002; Trends in Plant Science).

Las plantas carecen del complejo mecanismo de protección constituido por el sistema inmune de los animales; no obstante, han desarrollado un sistema de defensa eficiente que les permite responder a diferentes estímulos perjudiciales causados por factores bióticos o abióticos. Entre las respuestas a estrés se incluye la producción de fitoxilipinas específicas, las cuales cumplen distintas funciones biológicas en las plantas. La biosíntesis de oxilipinas durante los eventos del desarrollo y en respuesta a factores de estrés se resume en la Fig. 2.



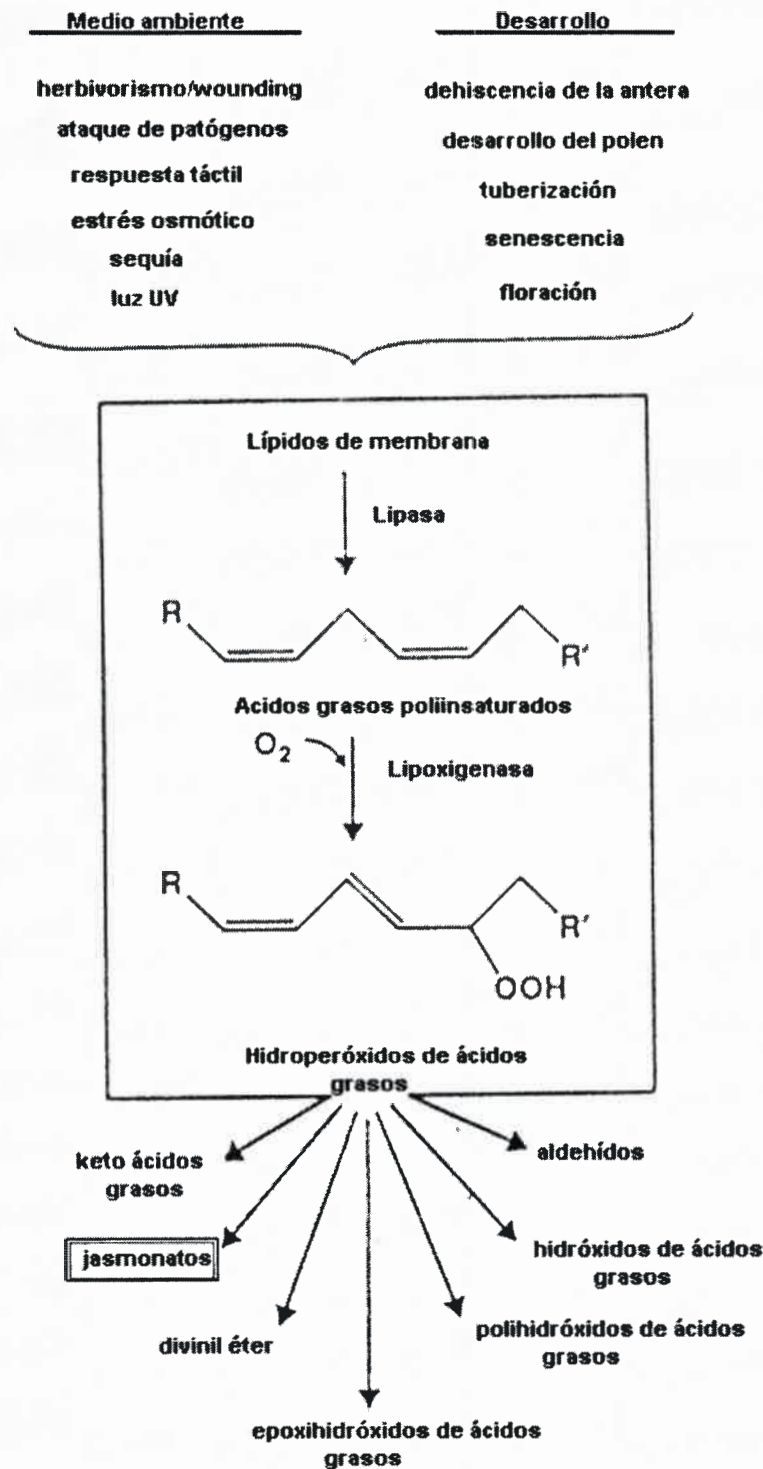


Fig. 2. **Biosíntesis de oxilipinas.** (Adaptado de Howe y Schillmiller 2002; Current Opinion in Plant Biology).



Las investigaciones realizadas sobre estos compuestos han estado focalizadas principalmente en la biosíntesis del grupo constituido por el ácido jasmónico (JA) y sus derivados, denominados colectivamente *jasmonatos* (JAs), así como también al papel que desempeñan en la regulación de numerosos procesos de las plantas.

La vía LOX para la biosíntesis de oxilipinas

La biosíntesis de estos compuestos es iniciada por una LOX que adiciona oxígeno molecular en posición 9 ó 13 del C18 de los ácidos linoleico y linolénico. Los términos 13-LOX y 9-LOX se utilizan para describir 2 vías enzimáticas que generan 13 ó 9 hidroperóxidos de ácidos grasos, respectivamente (Fig. 3).

Las plantas expresan numerosas isoformas de LOXs que pueden ser diferenciadas por sus patrones de expresión, localización subcelular y especificidad de sustrato (Hildebrand y col. 1998; Schewe 1998). Se ha demostrado que los hidroperóxidos derivados de LOX son metabolizados en una serie de oxilipinas por la acción de diversas enzimas, entre las que se incluye la óxido de aleno sintasa (AOS), hidroperóxido liasa (HPL), divinil éter sintasa (DES) y la propia LOX (Blée 1998; Feussner y col. 2001).

AOS, HPL y DES son miembros estrechamente relacionados de la familia citocromo P450 designada como CYP74 (Song y col. 1993; Itoh y col. 2001), la cual difiere de las formas clásicas de P450s por su reacción exclusiva con hidroperóxidos de ácidos grasos en lugar de usar oxígeno molecular y agentes reductores.

Durante la década pasada diversos autores se avocaron a analizar una rama específica de la vía LOX, la “vía octadecanoica”, que resulta en la producción de JA y sus derivados. Este importante grupo de moléculas está conformado, además de JA, por su forma metilada denominada metil jasmónico (ME-JA), por conjugados con numerosos aminoácidos, como por ej. con isoleucina (JA-Ile), derivados hidroxilados en posición 11 ó 12 (11-OH-JA y 12-OH-JA), y derivados glucosilados como constituyentes menores. JA y su derivado volátil, ME-JA son de hecho algunas de las señales derivadas de ácidos grasos mejor estudiadas en plantas.

En adición, la forma metilada del ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) identificado con la abreviatura ME-OPDA, fue detectado en hojas de cebada (Kramell y col. 2000) y en raíces transformadas de tomate (Abdala y col. 2003).



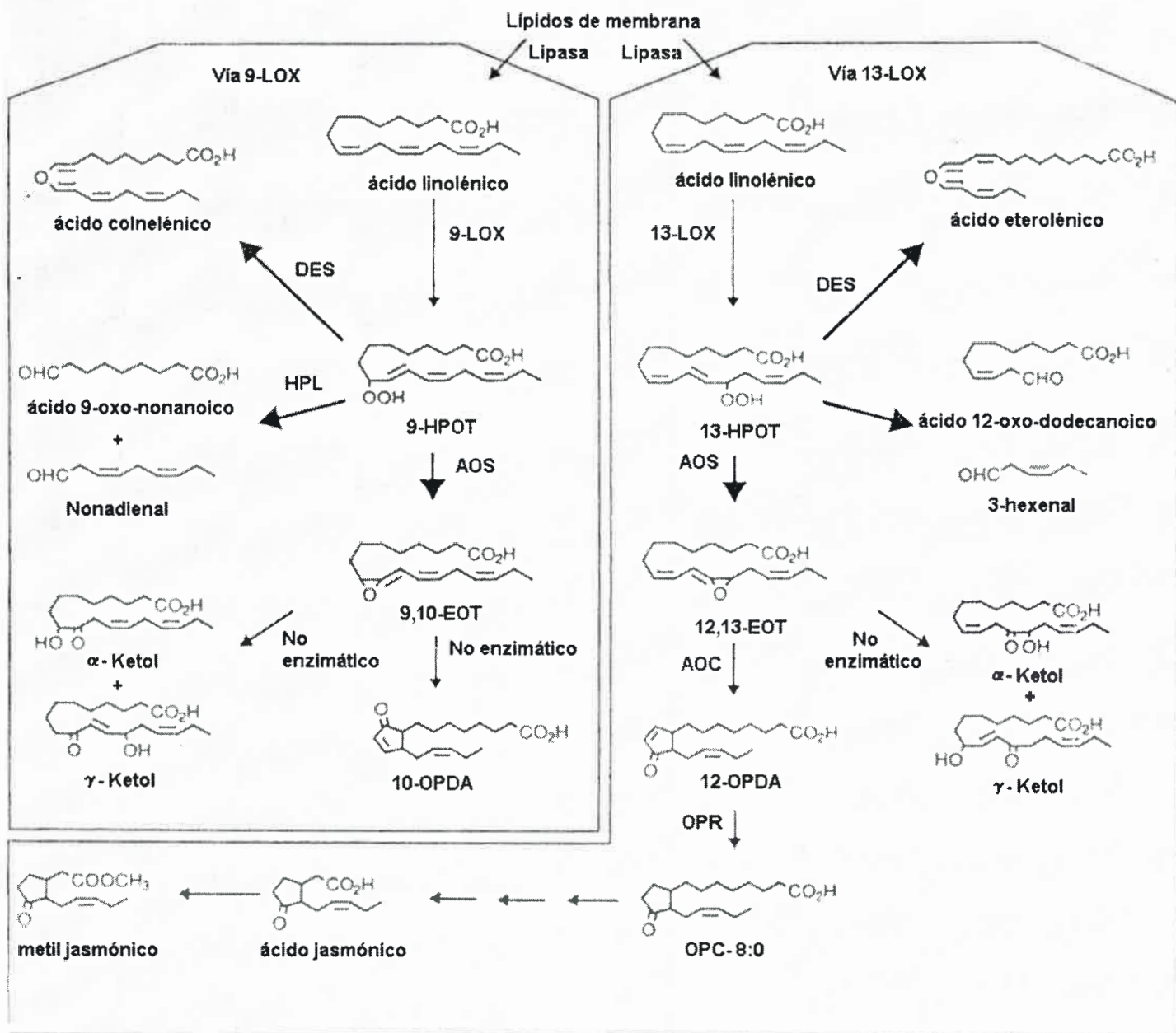


Fig. 3. Vías 9-LOX y 13-LOX para el metabolismo de productos derivados del ácido linolénico (α -LA). (Adaptado de Howe y Schilmiller 2002; Current Opinion in Plant Biology).

En la Fig. 3 se observa que JA es sintetizado a través de la rama AOS de la vía 13-LOX, iniciada por la oxigenación del ácido α -linolénico (α -LA) (Feussner y Wasternack 2002).



Por introducción de oxígeno molecular en posición 13 de α -LA se forma el ácido 13 hidropéroxido-octadecatrienoico (13-HPOT), el cual puede ser metabolizado por AOS a óxido de aleno. Este intermediario es altamente inestable en solución acuosa y por lo tanto es convertido por una óxido de aleno ciclasa (AOC) en ácido *cis*(+)12-oxofitodienoico (OPDA), dando como resultado final JA, de estructura enantiomérica y de ocurrencia natural en plantas.

La rama HPL de la vía 13-LOX conduce a la formación de aldehídos como el hexenal y una vía no enzimática produce α y γ -ketoles, precursores estos últimos de la traumatina, compuesto involucrado en la cicatrización de heridas causadas por daños (Zimmerman y Coudron 1979). Los aldehídos producidos por la vía 13-HPL son compuestos volátiles que desempeñan funciones en la defensa contra insectos y patógenos (Blée 1998; Bate y Rothstein 1998; Vancanneyt y col. 2001). La función de los productos de los 13-HPOT generados por DES, tales como divinil éter y el ácido eterolénico, es aún desconocida (Grechkin y col. 1995; Hamberg 1998).

En la vía 9-LOX, el metabolismo de 9-HPOT por AOS, HPL y DES origina un grupo de oxilipinas estructuralmente relacionadas pero algo diferentes a las derivadas de la vía 13-LOX. Diversos estudios indican que la vía 9-LOX es esencial en la defensa de la planta contra patógenos. Weber y col. (1999) demostraron que los divinil éter se acumulan en hojas de papa infectadas con *Phytophthora infestans* y que tales compuestos son capaces de inhibir el crecimiento del hongo. Los productos de esta vía también se hallan involucrados en la respuesta hipersensible inducida por elicitores fúngicos (Rusterucci y col. 1999).

Por otra parte, la rama AOS de la vía 9-LOX resulta también en la producción de α y γ -ketoles y del ácido 10-oxo-fitodienoico (10-OPDA) (Hamberg 2000; Grechkin y col. 2000). Este compuesto y otros productos derivados de la vía 9-LOX regulan el desarrollo del tubérculo en papa transgénica (Kolomiets y col. 2001).



Biosíntesis de JA y localización subcelular de enzimas biosintéticas

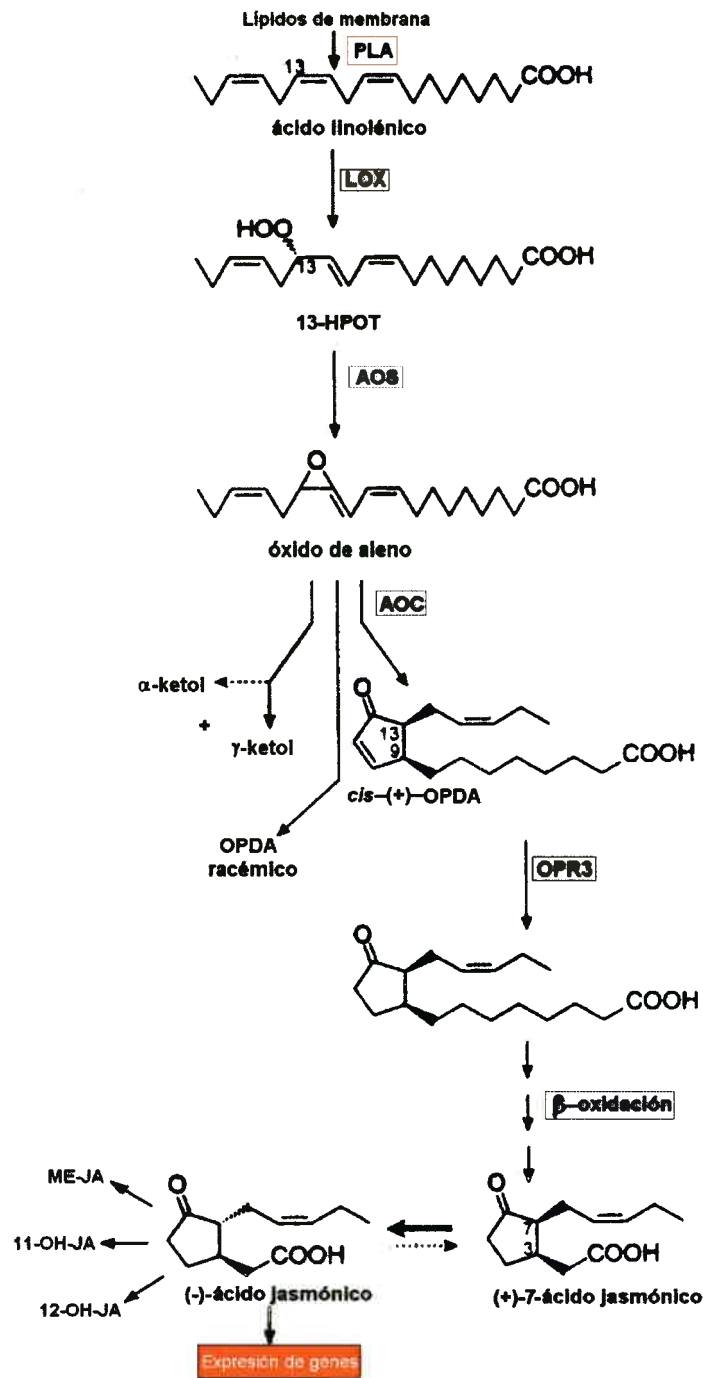


Fig.4. Biosíntesis de JA y productos 13-LOX derivados de α-LA (Adaptado de Stenzel y col. 2003; The Plant Journal).



La biosíntesis de JAs se origina a partir del ácido graso poliinsaturado (PUFA) α -ácido linolénico (α -LA) mediante la inserción de oxígeno molecular en el C13 catalizada por la 13-LOX, conduciendo a la formación de 13-HPOT, el cual es convertido por AOS a un óxido de aleno altamente inestable (ácido 12, 13-epoxi-octadecatrienoico). Este óxido de aleno, por AOC origina OPDA. Debido a la especificidad de este enantiómero el paso catalizado por AOC es de especial importancia (Feussner y Wasternack 2002) (Fig. 4).

Los primeros compuestos cíclicos en la ruta biosintética de JA son OPDA y dinor-OPDA (dnOPDA). El descubrimiento de dnOPDA producto del ácido hexadecatrienoico (16:3), cuya presencia ocurre conjuntamente con OPDA, derivado de ácido linolénico (18:3), constituyó un importante hallazgo (Weber y col. 1997). OPDA y dnOPDA son reducidos por reductasas (OPRs) al ácido 3-oxo-pentenilo-ciclopentano-octanoico (OPC-8:0), el cual luego de tres ciclos de β -oxidación origina (+)-7-*iso*-ácido jasmónico (Wasternack y Hause 2002). *Arabidopsis* presenta la vía hexadecanoica (16:3) paralela a la octadecanoica (18:3) (Weber y col. 1997).

La mayoría de los genes que codifican las enzimas de la biosíntesis de JA han sido clonados y se han identificado diversos cDNAs de 13-LOXs, AOSs y OPRs a partir de varias especies de plantas (Schaller 2001; Feussner y Wasternack 2002).

Aunque hasta el momento más de 50 formas diferentes de LOX fueron clonadas (Feussner y Wasternack 2002), no existe una evidencia contundente sobre cuáles de las formas LOX actúa específicamente en la biosíntesis de JA. No obstante, se ha demostrado inmunocitoquímicamente que la proteína LOX está presente en cloroplastos del mesófilo de hojas de cebada (Feussner y col. 1995) y en plastidios de estolones de papa (Cenzano y col. 2007, en prensa).

En tomate, cuatro 13-LOXs (Heitz y col. 1997), dos 13-AOSs (Howe y col. 2000; Sivasankar y col. 2000), una 9-AOS (Itoh y col. 2002), una AOC (Ziegler y col. 2000) y tres OPRs (Strassner y col. 2002) fueron caracterizadas. En *Arabidopsis* se encontraron una AOS, cuatro AOCs y tres OPRs (Laudert y col. 1998; Stenzel y col. 2003; Strassner y col. 2002). Esta comparación sugiere que la síntesis de JA podría ser regulada diferencialmente en estas especies.

Además se demostró que los péptidos de tránsito cloroplásticos de 13-LOXs, 13-AOSs y AOC son funcionales (Howe y col. 2000; Stenzel y col. 2003; Ziegler y col. 2000) y que la enzima OPR3, que posee un péptido de tránsito peroxisomal (Stintzi y Browse 2000), está localizada dentro de los peroxisomas (Strassner y col. 2002).

A nivel de tejidos y órganos se detectó la presencia de algunas enzimas involucradas en la síntesis de JAs (Hause y col. 2000), en hojas (Wasternack y Hause 2002), raíces (Hause y col. 2002) y mesocótilo (Maucher y col. 2000). Este último ejemplo indica que la biosíntesis de JAs no está limitada a los cloroplastos fotosintéticamente activos.

AOC fue detectada en haces vasculares de tallos, pecíolos, nervaduras principales de hojas y óvulos de yemas florales de tomate (Hause y col. 2000), y en haces vasculares, yemas florales y distintos estadios ontogenéticos de *Arabidopsis thaliana* (Hause y col. 2003). Recientemente, se la encontró en haces vasculares y plastidios de estolones de papa (Cenzano y col. 2007, en prensa). AOS se expresa en hojas jóvenes, primer entrenudo y nudo escutelar de cebada, sitios donde se detectan elevados niveles de JA (Maucher y col. 2000).

Diferentes tipos de estrés resultan en incrementos endógenos de JAs y frecuentemente son acompañados por una regulación transcripcional de AOS, AOC y OPR3 (Hause y col. 2000; Maucher y col. 2000; Ziegler y col. 2000). En tomate, la mayoría de los genes que codifican estas enzimas son inducidos por JA (Strassner y col. 2002).

En cuanto a las OPRs, de las tres identificadas en *Arabidopsis*, sólo OPR3 es activa en la ruta metabólica de JAs (Müssing y col. 2000; Schaller y col. 2000). Por otra parte, la β -oxidación es catalizada por tres proteínas: acil-CoA oxidasa (ACX), la proteína multifuncional (MFP), y la L-3-ketoacil-CoA tiolasa (KAT). Posiblemente, la actividad de una tioesterasa adicional estaría involucrada en la liberación de JA del JA-CoA, producto final de la β -oxidación (Li y col. 2005).

Asimismo, las enzimas de la biosíntesis de JA son estimuladas por aplicaciones exógenas con JAs. Luego de 1 h de tratamiento las hojas acumulan diversos mRNA, incluyendo mRNA-LOX de tomate (Heitz y col. 1997; Pedranzani y col. 2003), cebada (Vörös y col. 1998) y papa (Royo y col. 1996), AOS de *Arabidopsis* (Laudert y Weiler 1998), tomate (Sivasankar y col. 2000; Howe y col. 2000; Pedranzani y col. 2003) y cebada (Maucher y col. 2000), AOC de tomate (Stenzel y col. 2002) y OPR₃ de *Arabidopsis* (Müssing y col. 2000).

En la Fig. 5 se muestra la localización subcelular de enzimas relacionadas a la síntesis de JAs en *Arabidopsis*. Las LOXs, AOS y AOC están localizadas en cloroplasto y se sugiere que α -LA de cloroplasto actúa como sustrato para la biosíntesis de JAs (Feussner y col. 1995; Bleé y Joyard 1996; Wasternack 2006).

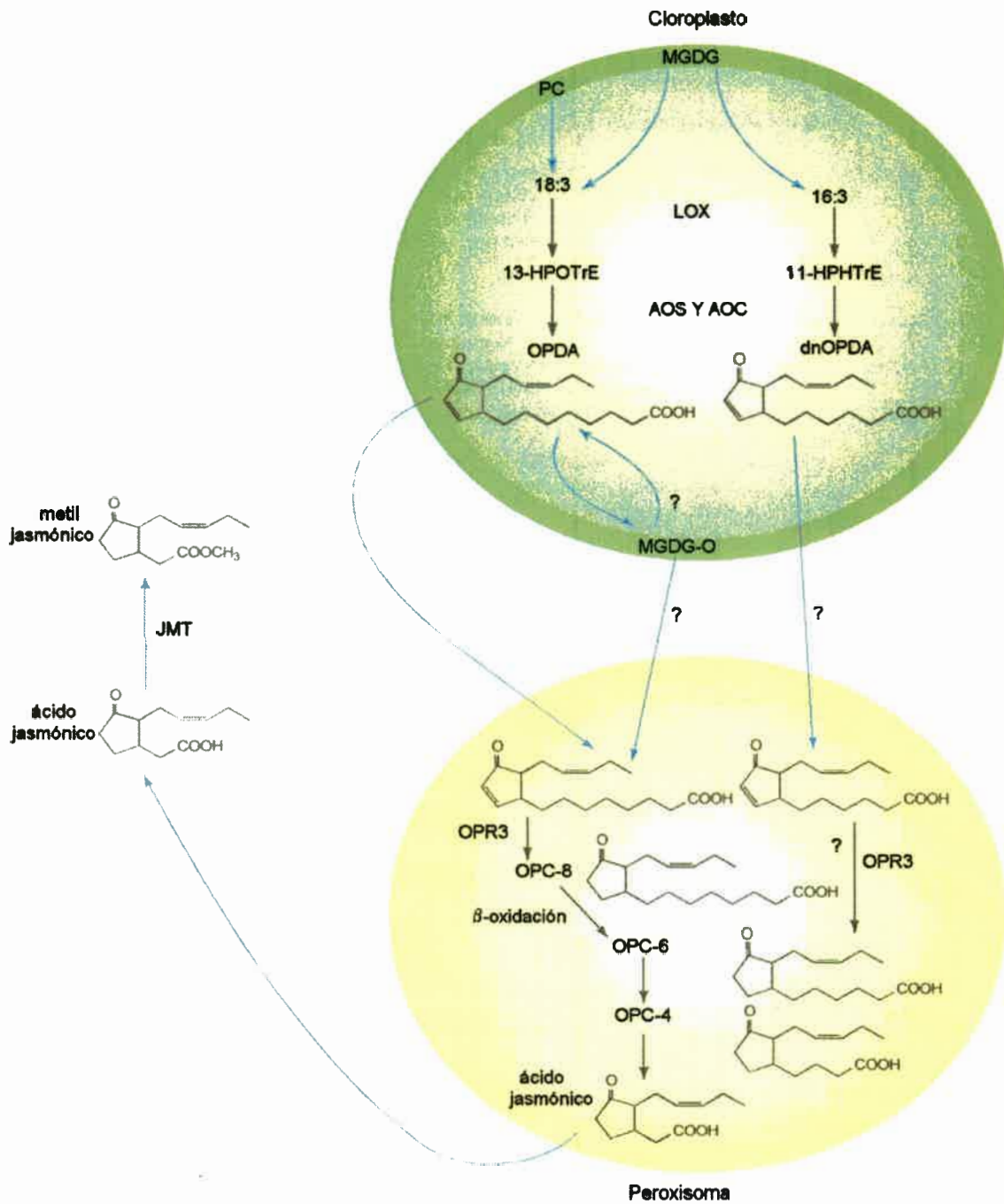


Fig. 5. **Biosíntesis de JAs y localización subcelular de enzimas en *Arabidopsis*.**
 En azul se indica el flujo de JAs y los signos de interrogación indican que no existe evidencia experimental para estos pasos (Adaptado de Weber H. 2002; Trends in Plant Science).

La biosíntesis de estos compuestos comienza en el cloroplasto a partir de ácidos grasos 18:3 (vía octadecanoica) y 16:3 (vía hexadecanoica).



La fuente para la síntesis de JAs puede ser probablemente un monogalactosil diacil glicerol (MGDG) (16:3 y 18:3) y fosfatidilcolina (PC) (18:3).

En cloroplasto, la ruta culmina con la formación de OPDA y dnOPDA. La mayor parte de OPDA se encuentra esterificado a lípidos de la membrana (MGDG-O), aunque también podría existir un intercambio continuo entre la forma libre y esterificada en el cloroplasto. Actualmente se desconoce cómo OPDA, generado dentro del cloroplasto, es transferido al peroxisoma.

OPDA y dnOPDA abandonan el cloroplasto para actuar como moléculas señales o ser metabolizados en el peroxisoma, donde tiene lugar la reducción del anillo ciclopentenona y los tres pasos de β -oxidación. JA, y quizás también las oxo-pentenil-ciclopentanonas (OPCs), abandonan el peroxisoma para actuar, al igual que en caso anterior, como señales. Posteriormente, en citosol JA puede ser metilado a su contraparte volátil, ME-JA (Weber 2002).

Funciones de JAs

Los JAs modulan diversos procesos del desarrollo en plantas. Entre algunos de ellos se encuentran la inhibición de la germinación (Wilén y col. 1991; 1994) y del crecimiento radical (Yamane y col. 1982; Staswick y col. 1992; Berger 2002), la estimulación del desarrollo floral (Creelman y Mullet 1997) y del enrollamiento de los zarcillos (Falkenstein y col. 1991; Weiler y col. 1994; Blechert y col. 1999), la dehiscencia de la antera (Ishiguro y col. 2001; Mandaokar y col. 2003), la producción de polen viable (Wallis y Browse 2002; Mandaokar y col. 2003), la inducción de la tuberización en papa (Pelacho y Mingo-Castel 1991), la maduración de frutos (Parthier 1991), la abscisión foliar (Parthier 1991) y la promoción de la senescencia (Creelman y Mullet 1997; Wasternack y Hause 2002).

Hasta el momento no se ha hallado en la literatura informe científico alguno que permita conocer qué ocurre exactamente con los niveles de JAs durante la germinación de semillas.

Los JAs, además de ABA, etileno y ácido salicílico, funcionan como miembros activos de la cascada de señales involucrada en las respuestas a estrés biótico y abiótico.

Respecto a la participación de JAs en estrés abiótico, Lehmann y col. (1995) informaron que el contenido endógeno de JAs incrementa rápidamente en segmentos de hojas de cebada sometidos a estrés osmótico con sorbitol o manitol.



Sin embargo, con NaCl en relativa alta concentración los niveles de estos compuestos no se modificaron y hubo ausencia de proteínas inducidas por ellos (Kramell y col. 1995); más aún, hojas de cebada expuestas a estrés salino no expresaron la proteína *JIP37* (Leopold y col. 1996). Sin embargo, en raíces de arroz sometidas a estrés salino se produjo un aumento gradual de ME-JA e inducción de una peroxidasa catiónica y dos nuevas proteínas relacionadas a patogénesis (Moons y col. 1997). Posteriormente, Kramell y col. (2000) observaron en cebada un rápido y transitorio aumento en el contenido de JA, OPDA y sus respectivos metil-ésteres luego de tratamientos con sorbitol o manitol; OPDA se acumuló en un nivel 2.5 veces superior al de los otros compuestos.

En tomate, cambios en el contenido de JA, proteínas LOX y fosfolípidos en raíces de dos cultivares, Pera (tolerante) y Hellfrucht Fruhstamm (HF) (sensible), en respuesta a sal fueron informados por Pedranzani y col. (2003). Estos autores también mostraron que los tallos y raíces de ambos cultivares acumularon JA, OPDA, y en muy baja proporción JA-Ile. Las plantas del cv. Pera presentaron una concentración endógena de JA superior a la de HF, lo que sugiere una relación directa entre niveles elevados de JA y tolerancia a estrés. Ambos cultivares respondieron diferencialmente al estrés salino; el cv. HF evidenció cambios en el contenido de JA en tallos y raíces luego de 6 h de tratamiento con 100 mM de NaCl, mientras que en el cv. Pera JA disminuyó en ambos órganos. Sin embargo, a las 72 h post-salinización, el contenido de JA en raíces del cv. Pera alcanzó el nivel observado en las controles. Estos resultados indican que JA está involucrado en la percepción de factores de estrés.

En cuanto a estrés biótico, el daño en hojas ocasionado por la masticación de insectos es acompañado por la producción de diversos compuestos de señalización, entre ellos JAs (Farmer y Ryan 1992), ABA (Peña-Cortés y Willmitzer 1995), etileno (O'Donnell y col. 1996), ácidos oligogalacturónicos (OGAs), sistemina (Pearce y col. 1991) y especies reactivas de oxígeno (Orozco-Cárdenas y Ryan 1999; Orozco-Cárdenas y col. 2001).

En consecuencia, las plantas son capaces de defenderse del ataque de insectos mediante mecanismos químicos, entre los que se distinguen por lo menos tres en donde los JAs actúan como señales: 1) la producción de proteínas de defensa, tales como inhibidores de proteasas (PINs), que inhiben a las proteasas digestivas propias del herbívoro, 2) la síntesis de fitoalexinas como alcaloides, y 3) la producción de sustancias volátiles capaces de atraer insectos depredadores.



Sin embargo, la implicancia de JA en la defensa contra patógenos fue confirmada hace pocos años utilizando como herramienta mutantes incapaces de acumular JA; estos mutantes no sobrevivieron cuando fueron atacados por patógenos (Vijayan y col. 1998).

Ácido abscísico y derivados

Ácido abscísico (**ABA**) es otra importante fitohormona que coordina el crecimiento y desarrollo de las plantas además de estar involucrada en las respuestas a factores de estrés ambiental. Su estructura química fue identificada por Addicott y col. (1964) como un sesquiterpeno ($C_{15}H_{20}O_4$).

El contenido de ABA en un tejido u órgano resulta de la combinación de transporte, biosíntesis y catabolismo (Zaharia y col. 2004). Estos procesos están influenciados por factores del desarrollo y de tipo ambiental tales como luz y estrés hídrico, entre otros (Cutler y Krochko 1999). En plantas, ABA es sintetizado y degradado continuamente (Zhou y col. 2003) y los genes que codifican las principales enzimas biosintéticas han sido identificados y clonados (Schwartz y col. 2003).

En plantas superiores, ABA es sintetizado a través de escisión oxidativa de un precursor carotenoide de 40C. El primer paso, la epoxidación de zeaxantina y anteraxantina a violaxantina, ocurre en plastidios y es catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP). Luego de una serie de modificaciones estructurales, violaxantina es convertida a 9-*cis*-neoxantina cuya escisión oxidativa por la acción de 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) produce un intermediario de 15C, xantoxina. Subsecuentemente, este compuesto es exportado hacia el citosol donde es convertido a ABA, vía ABA-aldehído, mediante dos reacciones enzimáticas catalizadas por ABA aldehído oxidasa (AAO) (Taylor y col. 2000; Finkelstein y col. 2002; Seo y Koshiba 2002; Xiong y Zhu 2003; Schwartz y Zeevaart 2004). La forma natural es (+)-(S)-ABA y su foto-isomerización produce el desdoblamiento en aproximadamente un 50% de los *isómeros cis* y *trans*, siendo la forma *cis* la biológicamente activa (Fig. 6).

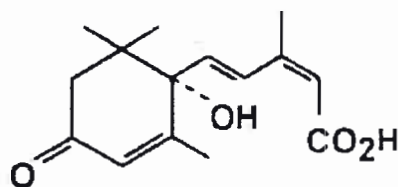


Fig. 6. Estructura química del ácido abscísico (ABA).

Respecto al catabolismo de ABA, se han aislado varios metabolitos de diversas especies vegetales. ABA puede ser metabolizado a través de dos vías principales: oxidación en diferentes posiciones y conjugación (Cutler y Krochko 1999; Hirai 1999; Xu y col. 2002; Oritani y Kiyota 2003). La preferencia por una u otra vía depende de la especie, el órgano particular, el estadio de desarrollo y de los procesos biológicos involucrados (Cutler y Krochko 1999; Zeevaart 1999; Oritani y Kiyota 2003). En plantas, la vía oxidativa es predominante con respecto a la conjugación, y se inicia por hidroxilación en el C-8' para originar un intermediario inestable, 8'-hidroxi-ABA (8'-OH-ABA), el cual espontáneamente se isomeriza a ácido faseico (**PA**) (Cutler y Krochko 1999; Todoroki y col. 2000). Este compuesto posteriormente es reducido a ácido dihidrofaseico (**DPA**) y/o su epímero, ácido *epi*-dihidrofaseico (*epi*-**DPA**) (Zeevaart y Milborrow 1976; Zeevaart y Creelman 1988; Zeevaart y col. 1991).

Recientemente, Zhou y col. (2004) reportaron la existencia de una nueva vía oxidativa en la cual la hidroxilación de ABA ocurre en los grupos metilos 7', 8' y 9'. El nuevo compuesto aislado de extractos vegetales fue identificado como la forma cerrada de 9'-hidroxi-ABA (9'-OH-ABA) y fue llamado ácido *neo*-faseico (**neoPA**). Se observó que los niveles de este metabolito son altos en semillas inmaduras de tomate y disminuyen en estadios posteriores del desarrollo, sugiriendo así un ulterior metabolismo (Zaharia y col. 2005).

ABA y sus productos oxidados pueden ser conjugados como ésteres, particularmente como glucosil ésteres (**ABA-GE**) o bien como glucósidos (Zeevaart 1999; Oritani y Kiyota 2003). ABA-GE es uno de los metabolitos conjugados mayoritarios y probablemente desempeñaría un rol en el transporte de ABA (Sauter y col. 2002). La abundancia de este compuesto es menor comparada con la de ABA y podría constituir una reacción de inactivación reversible utilizada para regenerar ABA libre. En algunos tejidos, la formación de glucosil-conjugados es la principal vía de inactivación de ABA (Zeevaart, 1999). En general, estos metabolitos se almacenan en la vacuola donde no están expuestos a hidrólisis.

La actividad hormonal reportada para algunos metabolitos de ABA (Zhou y col. 2004) lleva a sugerir que estos compuestos podrían desempeñar funciones como mediadores de efectos hormonales hasta el momento asociados exclusivamente a ABA. Por lo tanto, para una correcta comprensión del rol de ABA en plantas es necesario un análisis cuantitativo no sólo de la hormona sino también de sus metabolitos (Setha y col. 2005).



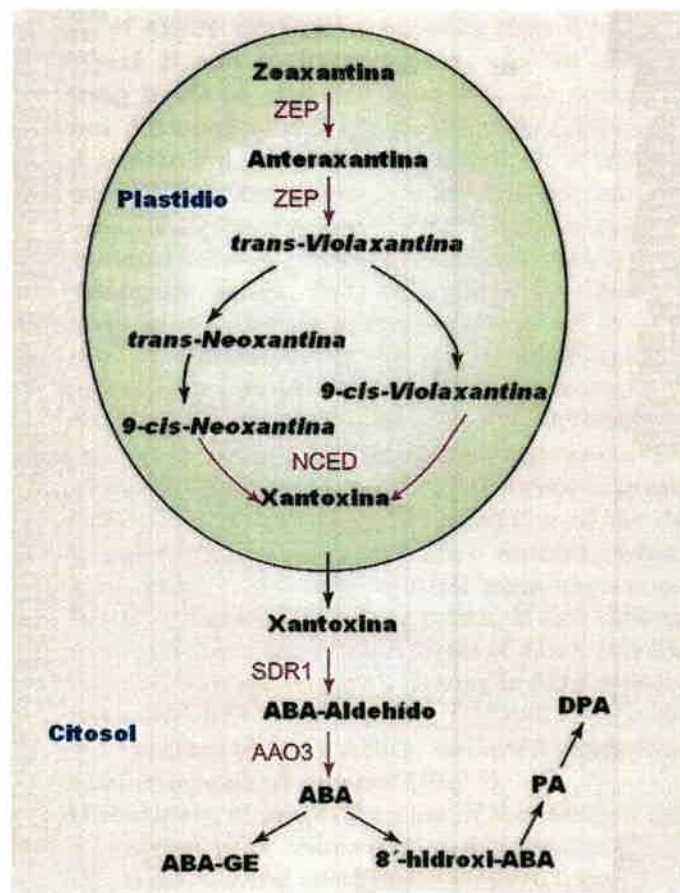
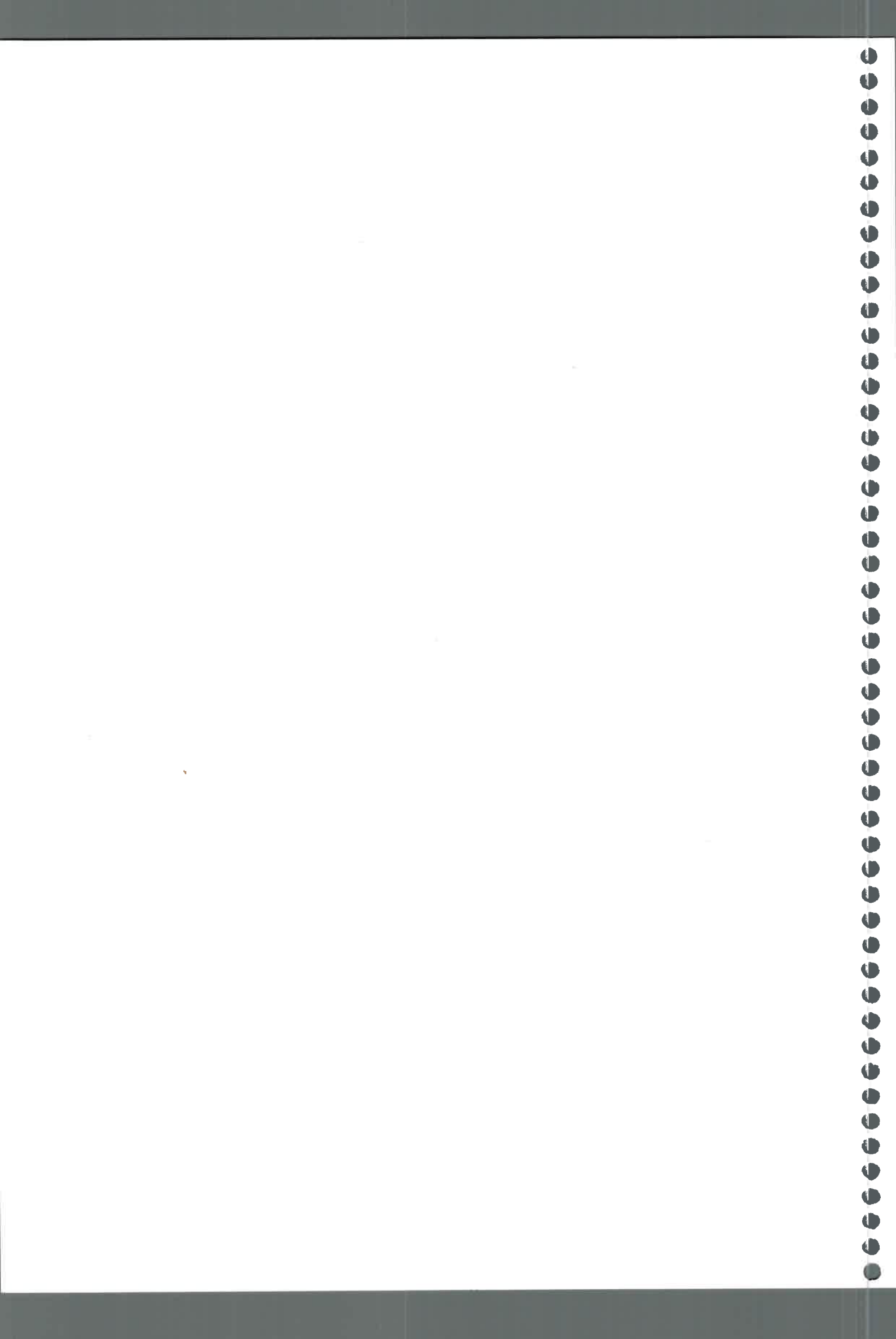


Fig. 7. Biosíntesis de ABA y metabolitos (Adaptado de Nambara y Marion-Poll 2003; Trends in Plant Science).

Funciones de ABA

ABA desempeña un rol primordial en la adaptación de las plantas a condiciones adversas tales como salinidad, sequía, bajas temperaturas y estrés osmótico (Leung y Giraudat 1998; Zhu 2002; Xiong y Zhu 2003); además afecta la tolerancia de la planta a estrés por calor (Robertson y col. 1994) y por patógenos (Mohr y Cahill 2003).

Asimismo, interviene en numerosos procesos celulares y regula diversas etapas del desarrollo de la planta, como maduración de la semilla, y síntesis de proteínas y lípidos de reserva (Seo y Koshiba 2002; Xiong y Zhu 2003), promoción de la tolerancia a desecación de semillas y tejidos vegetativos (McCourt 2001; Finkelstein y col. 2002), inducción y mantenimiento de la dormición (Karssen y col. 1983; Rock y Quatrano 1995; Koornneef y col. 2002; Kushiro y col. 2004; Okasabe y col. 2005), inhibición de la fase de transición embrionaria a crecimiento germinativo, y de crecimiento vegetativo a crecimiento reproductivo (Leung y Giraudat 1998; Rock 2000; Rohde y col.



2000b), polinización (Kovaleva y Zakharova 2003) y senescencia (Hunter y col. 2004). Además, ABA se comporta como un importante inhibidor de la germinación y/o crecimiento de la plántula (Carles y col. 2002; Finkelstein y col. 2002). Estas diversas funciones involucran mecanismos regulatorios complejos que controlan la producción, degradación, percepción y transducción de la señal de ABA (Xiong y Zhu 2003).

En angiospermas, la acumulación de ABA en semillas en desarrollo resulta de su transporte desde los tejidos maternos (Hoad 1995; Frey y col. 2004) y de la síntesis *de novo* en el embrión (Xiong y Zhu 2003; Frey y col. 2004). Durante la maduración, la acumulación de ABA es menor en los estadios tempranos, aumenta en la etapa media cuando las reservas comienzan a ser sintetizadas, y disminuye cuando las semillas se deshidratan. La prevención de la germinación durante el desarrollo podría deberse al contenido endógeno de ABA (Berry y Bewley 1992).

La biosíntesis de ABA en semillas embebidas y en desarrollo podría ser regulada por múltiples señales; el estrés osmótico al comienzo de la maduración podría ser uno de los factores desencadenantes de la síntesis *de novo* de ABA. Así, la dinámica de este proceso sugiere que su biosíntesis se halla bajo estricta regulación durante el desarrollo embrionario.

Concluida la maduración de la semilla, su deshidratación y dormición, la posibilidad de incorporar agua -imbibición- iniciaría la germinación, la cual culmina con la emergencia de la radícula a través de la testa, marcando así el comienzo del crecimiento de la plántula.

En semillas de tomate, el endosperma micropilar que rodea al ápice radical es la estructura que impide el crecimiento de la raíz y limita la germinación, y por lo tanto su debilitamiento es requerido para la emergencia de la radícula. Este proceso es bifásico; el primer paso, no es inhibido por ABA y está correlacionado con la actividad de la endo- β -mananasa en el endosperma, y el segundo paso conduce a la finalización de la germinación y se halla bajo control de ABA (Toorop y col. 2000). En este sentido, ABA retrasa la acumulación de las enzimas que provocan el debilitamiento del endosperma y su posterior ruptura (Leubner-Metzger y col. 1995; 2000).

ABA no inhibe la etapa de imbibición inicial (dos primeras fases del proceso germinativo) necesaria para el comienzo del crecimiento embrionario, sino que impide la transición hacia la fase de crecimiento de la plántula, posterior a la emergencia de la radícula (López-Molina y col. 2001). No obstante, el modo de acción de este regulador sobre la prevención de la elongación radical aún no está claro (van den Wijngaard y col. 2005).

Mutantes hipersensibles a estrés abiótico

En la actualidad diversas aproximaciones genéticas son utilizadas en la determinación de genes y procesos fisiológicos claves involucrados en distintos tipos de estrés. Por lo tanto, el uso de mutantes hipersensibles a estrés salino y osmótico contribuirá al estudio de las respuestas de las plantas frente a estrés.

Un gran número de mutaciones que afectan la respuesta de las plantas a una hormona particular fueron identificadas mediante análisis genéticos. En este sentido, diversos mutantes han sido reportados con alteraciones en su sensibilidad a ABA (Leung y Giraudat 1998; Moller y Chua 1999). Asimismo, los mutantes biosintéticos y de señalización constituyen una herramienta muy útil a fin de dilucidar la complejidad de las funciones de los JAs como compuestos señales (Berger 2002; Turner y col. 2002).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado cuatro mutantes *sos* (*overly salt-sensitive*), los cuales son hipersensibles a NaCl e incapaces de crecer a bajas concentraciones de K⁺, esto demuestra que la nutrición de este ión es crítica en la tolerancia a sal (Wu y col. 1996; Liu y Zhu 1997; Zhu y col. 1998).

En tomate se han aislado y caracterizado tres mutantes *tss* (*tomato salt-sensitive*) hipersensibles a estrés iónico y/o osmótico (*tss1*, *tss2* y *tos1*). Estos mutantes definen 3 loci genéticos (*TSS1*, *TSS2* y *TOS1*) necesarios para la tolerancia a estrés salino, y son similares al cultivar silvestre MoneyMaker en su crecimiento en medio control ya que el fenotipo sólo se manifiesta en condiciones de estrés. Además se ha determinado que el fenotipo de hipersensibilidad es debido a la mutación de un solo gen. El hecho de que estos mutantes sean genéticamente idénticos al cultivar silvestre, con la excepción de un solo gen mutado, facilita el análisis sin el problema que supone el estudio de dos cultivares con alta variabilidad genética.

Estos mutantes han perdido ciertos mecanismos de tolerancia a sal y por consiguiente, son más sensible a estrés que el cv. silvestre.

Posteriormente se determinó que el mutante *tss1* (*tomato salt-sensitive 1*) es hipersensible a estrés iónico, específicamente a la inhibición del crecimiento ocasionada por Na⁺ o Li⁺ y no es sensible a estrés osmótico general. El gen *TSS1* es necesario no sólo para la tolerancia a sal sino para la incorporación de K⁺ a bajas concentraciones (Borsani y col. 2001).

El mutante *tss2* (*tomato salt-sensitive 2*) es hipersensible a estrés iónico, en particular a Na⁺ pero no a Cl⁻. Además, en contraste a *tss1*, es hipersensible a estrés osmótico generado por manitol o sorbitol.

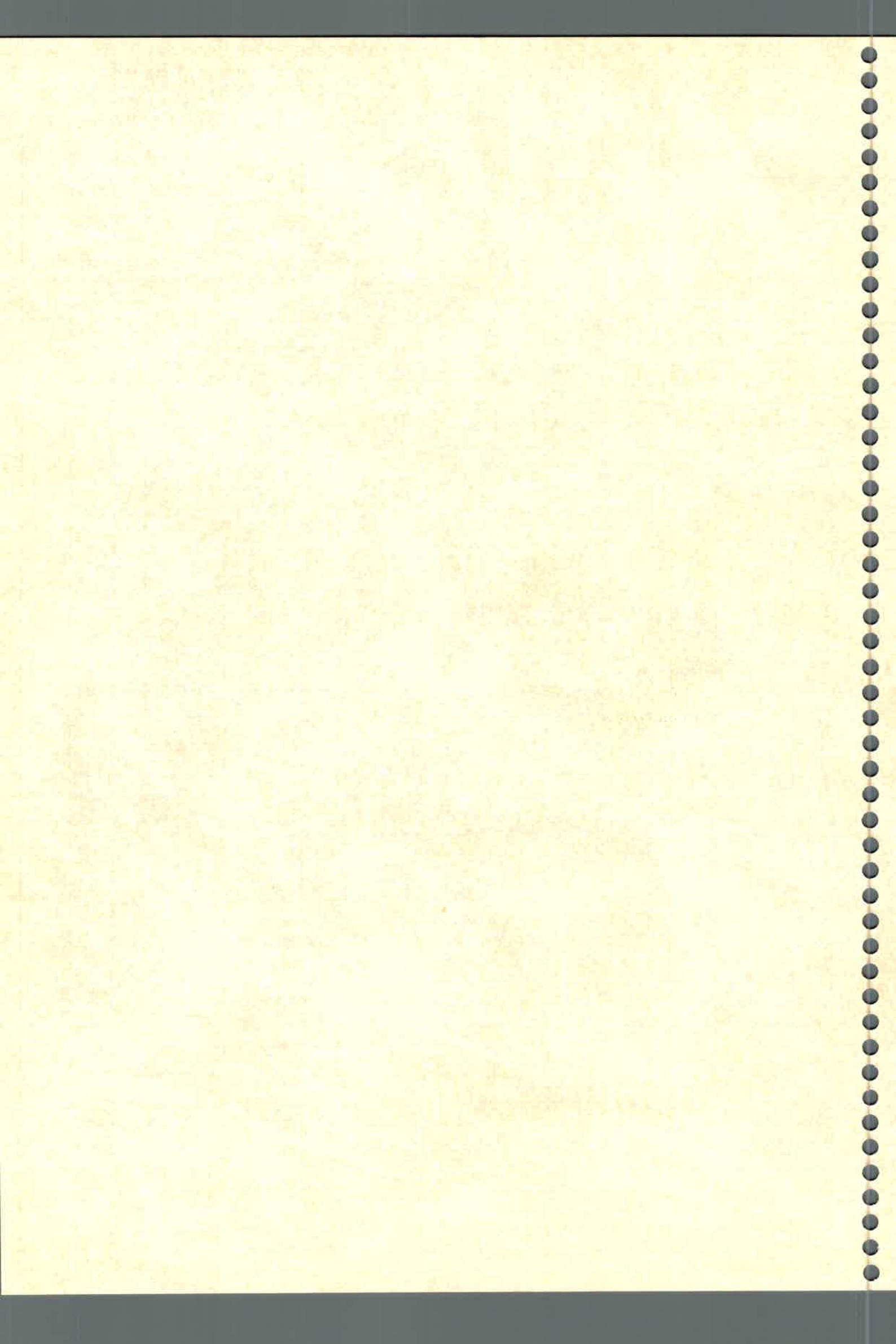
El locus *TSS2* es requerido para tolerancia a salinidad aunque no para el crecimiento en medio con baja concentración de K^+ (Borsani y col. 2001).

Por último, se ha aislado y caracterizado el mutante *tos1* (*tomato osmotic sensitive*) cuyo crecimiento es particularmente hipersensible a estrés osmótico (manitol) y a altas concentraciones de NaCl. El aislamiento y caracterización de *tos1* sugiere que NaCl sólo supone un estrés osmótico cuando se encuentra a altas concentraciones, dado que este mutante no fue hipersensible a concentraciones inferiores de 100 mM de NaCl (Borsani y col. 2002).

Asimismo, cuando estos autores evaluaron si el crecimiento de los mutantes se veía afectado en respuesta a la aplicación exógena de distintas concentraciones de ABA, encontraron que la inhibición del crecimiento causada por ABA fue mayor en *tss2* comparada con el resto de los germoplasmas. Por el contrario, no se registraron diferencias entre el crecimiento del wt y *tss1*.

En consecuencia, Borsani y col. (2001; 2002) proponen que la sensibilidad reducida de las plántulas *tos1* y por el contrario, la alta sensibilidad de las *tss2* podría ser provocada por un metabolismo anormal de ABA o por una alteración en la vía de transducción de la señal; demostrando así que *tss2* y *tos1* no constituyen mutantes deficientes en ABA.

HIPÓTESIS



Hipótesis

- ✦ Los niveles endógenos de jasmonatos, ácido abscísico y compuestos derivados de semillas secas de tomate, cv. silvestre (Moneymaker) y mutantes sensibles a estrés iónico y osmótico (*tss1*, *tss2* y *tos1*), se modifican durante el curso de la imbibición.

- ✦ Plántulas silvestres y mutantes sometidas a NaCl y manitol modifican diferencialmente el contenido de jasmonatos en respuesta a estos factores de estrés abiótico.

- ✦ El nivel de los ácidos jasmónico, abscísico y compuestos derivados será cuantitativamente diferente en semillas del cv. silvestre y de los mutantes, lo cual incide en la capacidad germinativa.



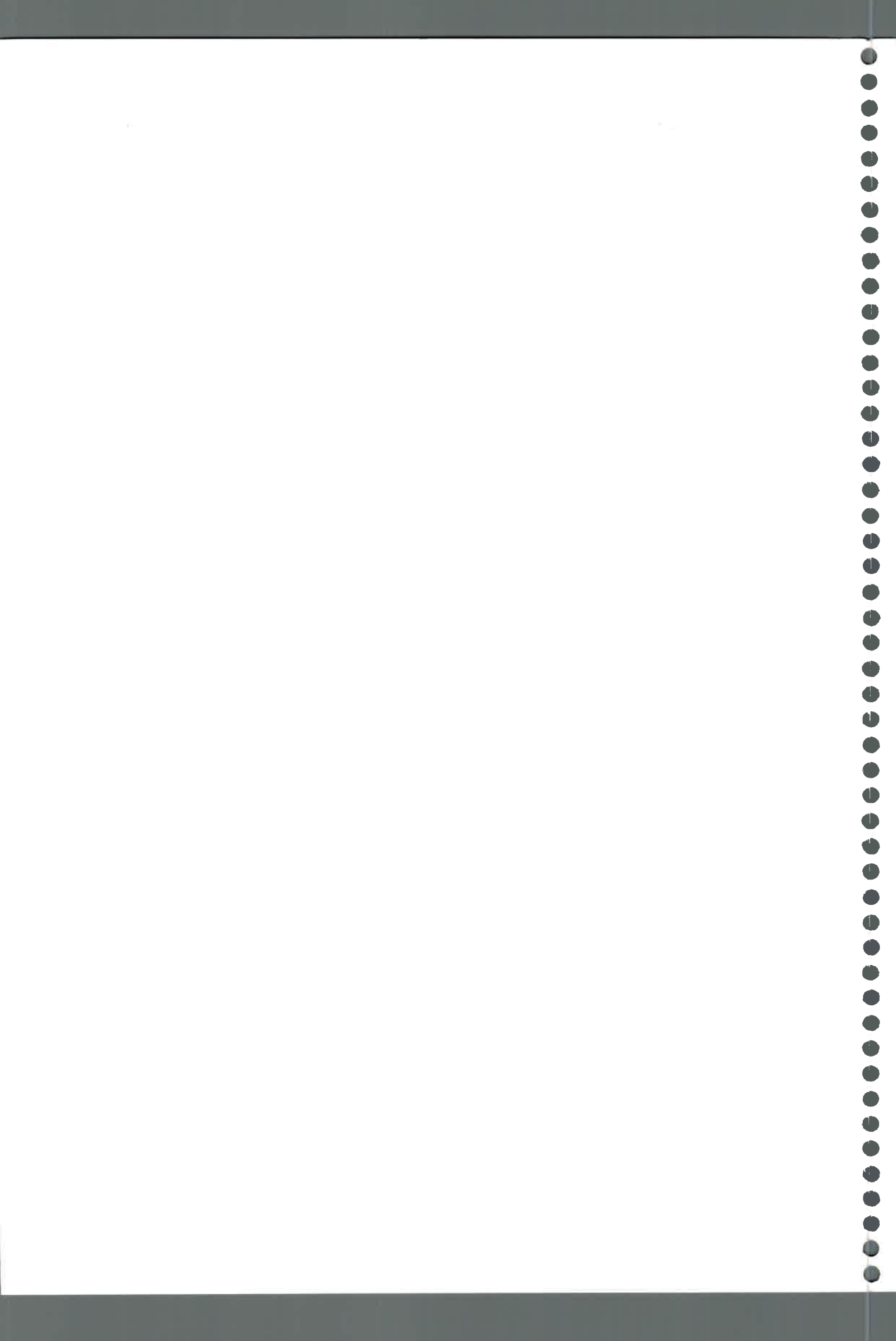
OBJETIVOS

Objetivo General

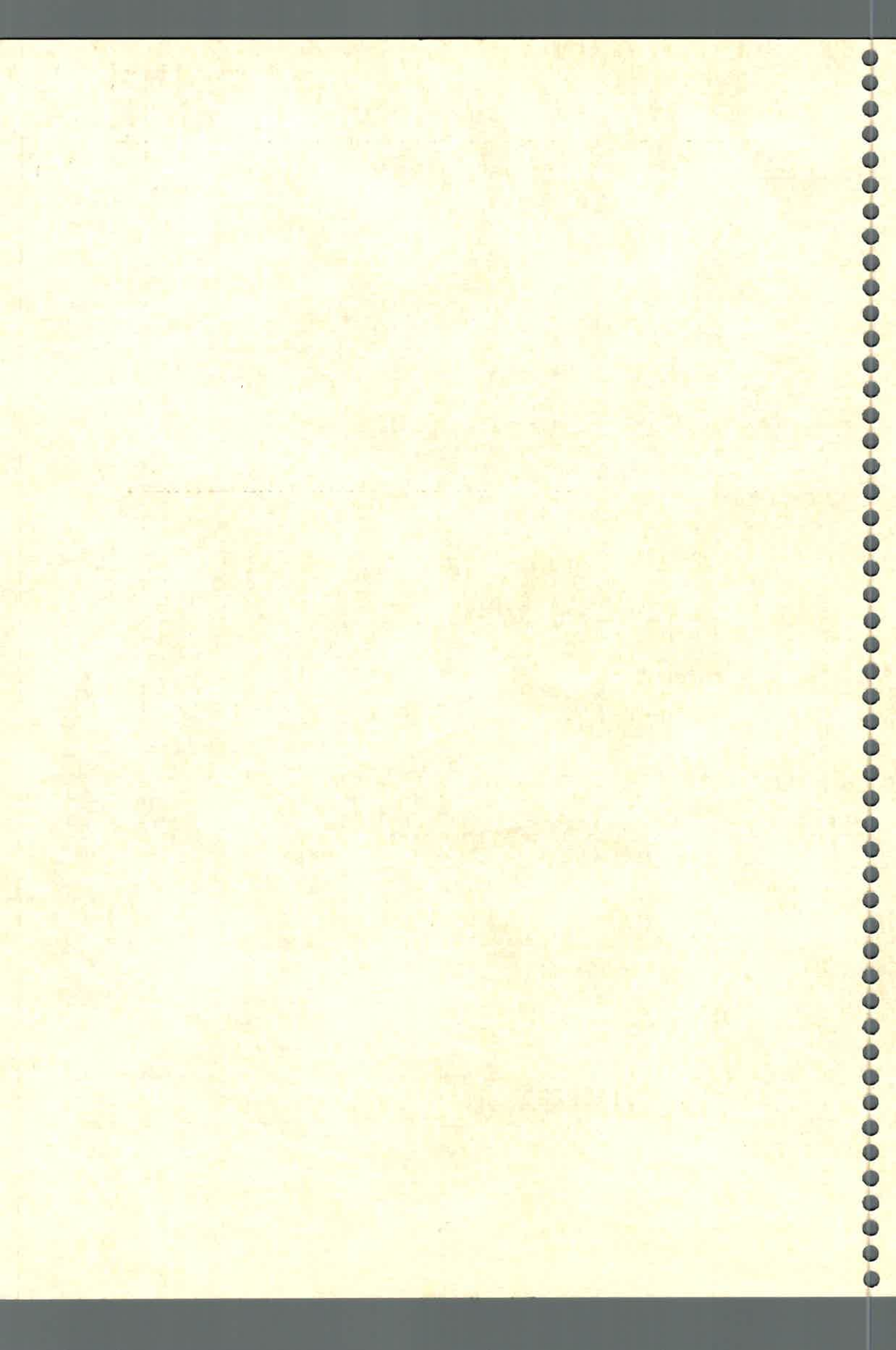
- ✚ Correlacionar niveles basales de jasmonatos, ácido abscísico y compuestos derivados con la sensibilidad a estrés abiótico y capacidad germinativa de los mutantes (*tss1*, *tss2*, *tos1*) de tomate obtenidos del cv. silvestre Moneymaker.

Objetivos específicos

- Cuantificar los niveles basales de ácido jasmónico, el precursor de la síntesis de jasmónico el ácido 12-oxo-fitodienoico, el derivado metílico y las formas hidroxiladas, en semillas secas del cv. Moneymaker y mutantes, en semillas embebidas y en el agua de imbibición.
- Cuantificar los niveles basales de los compuestos mencionados anteriormente en plántulas del cv. Moneymaker y en los mutantes hipersensibles a salinidad *tss1*, *tss2* y *tos1*; y a estrés osmótico *tss2* y *tos1* luego de someterlos a tratamientos con NaCl y manitol.
- Evaluar los niveles basales de ácido abscísico en semillas secas, embebidas y agua de imbibición del cv. Moneymaker y de los mutantes.
- Evaluar los niveles basales de ácido faseico, dihidrofaseico, y ABA-conjugado con glucosa en semillas secas y embebidas del cv. Moneymaker y de los mutantes.
- Comparar la capacidad germinativa de las semillas del cv. Moneymaker y sus respectivos mutantes en relación a los niveles hormonales endógenos.
- Comprobar el efecto de aplicaciones exógenas de ácido jasmónico, sus respectivos hidroxilados y de ácido abscísico sobre la germinación de semillas del cv. Moneymaker.



MATERIALES Y MÉTODOS





Materiales y Métodos

Material Vegetal

Semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Moneymaker y de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* se utilizaron para la realización de los ensayos programados.

Condiciones de imbibición de las semillas

Se utilizó un diseño aleatorio simple (Steel y Torrie 1995) empleando cuatro tiempos de imbibición diferentes. Para cada experimento, 20 semillas de tomate cv. Moneymaker y de los mutantes se colocaron en pequeños recipientes de 7 ml conteniendo 300 μ l de agua destilada, y se realizaron tres replicaciones por experimento (n=3). Se registró el número de semillas germinadas a las 12, 24, 48 y 72 h de iniciada la imbibición. A las 24 h y 48 h se adicionaron al medio 30 μ l de agua destilada a fin de mantener un buen nivel de humedad. Los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

Por otra parte, se emplearon semillas secas (0 h de imbibición).

Evaluación de la capacidad germinativa

La evaluación de la capacidad germinativa de las semillas wt y de los mutantes se efectuó mediante el recuento final de semillas germinadas (a las 72 h de iniciado el experimento) y la observación de la emergencia radical. Las determinaciones de porcentaje de germinación se realizaron bajo una lupa y fueron consideradas como germinadas aquellas semillas que mostraron la protusión de la radícula claramente visible (Ni y Bradford 1993).

Condiciones de crecimiento de las plántulas

Las semillas (20 por repetición) del cv. Moneymaker y de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* se colocaron en bandejas de plástico sobre una mezcla 50% v/v perlita neutra/arena fina y en condiciones ambientales generadas por una cámara de crecimiento programada con 8 h de oscuridad a 20 °C y 60% de HR

y 16 h de luz ($130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 27°C y 60% de HR. Estas condiciones fueron empleadas para el crecimiento de las plántulas controles y tratadas con NaCl; mientras que para el tratamiento con manitol se utilizó una cámara de crecimiento Conviron E15 programada con 8 h de oscuridad a 19°C y 60% HR y 16 h de luz ($130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 29°C y 65% HR.

El contenido hídrico del sustrato al momento de la siembra fue del 60% de la capacidad de campo (c.c); a partir del 5^{to} día se realizaron riegos a c.c. utilizando el método de ascenso capilar con solución Hoagland diluida a la mitad de su fuerza iónica. Los riegos se llevaron a cabo con una frecuencia de 3 días hasta el final de la experiencia.

Los tratamientos se efectuaron empleando concentraciones iso-osmóticas de 100 y 210 mM de NaCl y manitol respectivamente, y considerando que provocan un estrés moderado de acuerdo a resultados obtenidos previamente con un cv. de tomate tolerante (Pera) y otro sensible (Helfrucht fruchtamm) a estrés salino (Andrade A., Tesina de Grado 2001). El estrés salino y osmótico se aplicó a plántulas con los dos cotiledones expandidos y cuya longitud de parte aérea estaba comprendida dentro del rango de desviación de la media. Luego de 11 días de tratamiento las plántulas se cosecharon y procesaron.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa Statgraphics Plus, versión 3 (Manugistics, Rockville, Maryland, USA). Los datos de porcentaje de germinación fueron transformados mediante la función arco-seno. Se empleó un Análisis de la Varianza de una vía (ANNOVA) para comparar el efecto de los diferentes tiempos de imbibición sobre los niveles endógenos de las hormonas. La normalidad de los datos fue verificada con el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza con el test de Bartlett. Valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Extracción, purificación y estimación de jasmonatos

200 mg de peso seco (PS) de material vegetal (semillas secas, embebidas y plántulas) se homogeneizó en mortero con nitrógeno líquido y 10 ml de MeOH. Los siguientes estándares se adicionaron a cada muestra: 100 ng de ($^2\text{H}_6$)JA; 100 ng de ($^2\text{H}_5$)OPDA; 100 ng de 12-($^2\text{H}_3$)O Ac-JA y 100 ng de 11-($^2\text{H}_3$)O Ac-



JA. Posteriormente se realizó una segunda homogeneización en ultraturrax. El homogenato se filtró sobre una columna con filtro de celulosa en cámara de vacío Supelco VISIPREP DL a fin de obtener el sobrenadante, evaporándose luego a sequedad. A fin de realizar la acetilación de los hidroxilados endógenos se procedió a agregar, en una relación 2:1, piridina y ácido acético anhidro. Dicha reacción se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente, evaporándose posteriormente a sequedad.

Mini-columna DEAE-Sephadex A-25

El extracto seco obtenido se resuspendió en 10 ml de MeOH y purificó en una mini-columna conteniendo 3 ml de DEAE-Sephadex A25 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) en metanol 100%, previamente lavada con 10 ml de metanol 100%. Luego se agregó la muestra a la columna, diluida en un volumen máximo de 10 ml de MeOH. La elusión se realizó con 3 ml de MeOH y 3 ml de 0.1N AcOH en 100% MeOH, descartándose ambas fracciones. Posteriormente se agregaron 3 ml de 1N AcOH en 100% MeOH y 3 ml de 1.5 N AcOH en 100% MeOH. Estas dos fracciones, donde eluyen los compuestos ácidos como JA, se recolectaron y llevaron a sequedad en evaporador rotativo al vacío.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Los extractos secos se disolvieron en el solvente de corrida y analizaron por HPLC en columna Eurospher 100-C18 (5 μ m, 250 x 4 mm), acoplada a un sistema UV-Visible con arreglo de diodo. Se utilizaron como solvente A: metanol (MeOH) y solvente B: 0.2% (v/v) ácido acético en agua. La elusión se llevó a cabo mediante un gradiente 40% A a 100% A en 25 min. y una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. Luego se recogieron las fracciones correspondientes a los respectivos tiempos de retención (Rt): 14 min, Rt de JA; 22.5 min, Rt de OPDA; 9.30 min, Rt de 11-OH-JA; 11 min, Rt de 12-OH-JA, las cuales fueron determinadas a 210 nm. Dichas fracciones se evaporaron a sequedad.

Derivatización para JA, OPDA, 11-OH-JA y 12-OH-JA

Los extractos se resuspendieron en 200 μl de $\text{Cl}_3\text{CH}/N,N$ -di-isopropil-etilamina (1:1, v/v) y se derivatizaron con 10 μl de pentafluorobencilbromuro a 20°C durante una noche. Posteriormente se llevó a sequedad y resuspendió con 7 ml de n-hexano y se pasó a través de columna de Silica gel (SiOH ; 500mg) (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Los pentafluorobencil ésteres se eluyeron con una mezcla de 7 ml de n-hexano-dietiléter (2:1, v/v). Se evaporaron a sequedad y el extracto se retomó con 100 μl de acetonitrilo e inyectó en un GC-MS-SIM a fin de identificar y cuantificar los compuestos de interés.

Identificación y cuantificación por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa-monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM)

Se utilizó un espectrómetro de masa Hewlett Packard (modelo 5970 B) combinado con un cromatógrafo de gases HO 5890. El sistema de GC-MS-SIM consta de un equipo de computación de 9000/300-9133 HP. Las corridas en GC se realizaron en una columna de sílica Rtx-5w/Integra Guard (Restek, Germany) de 0.25 mm tamaño de partícula y 15m x 0.25mm de diámetro, conectada a una pre-columna inerte de 5 m. Se utilizó gas helio como carrier ($40 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). La temperatura de inyección fue de 250 °C y la de interfase de 275 °C. El espectro de masa se obtuvo a un voltaje de ionización química negativa de 100 eV. El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: 1 min 60 °C, 25 °C min^{-1} a 180 °C, 5 °C min^{-1} a 270 °C, 10 °C min^{-1} a 300 °C, 10 min 300 °C. Los tiempos de retención de los pentafluorobencil ésteres fueron: (2H₆)JA: 10min 30s; JA: 10min 36s; 11-(²H₃)OAc-JA: 14min; 11-OAc-JA: 14min 3s; 12-(²H₃)OAc-JA: 15min 39s; 12-OAc-JA: 15min 42s; (²H₅)OPDA: 20min 10s; OPDA: 20min 16s. Los fragmentos usados para la cuantificación de JA, 11-hidroxyjasmónico (11-OH-JA), 12-hidroxyjasmónico (12-OH-JA) y OPDA fueron: m/z 209, 215 (estándar), m/z 267, 270 (estándar), m/z 267, 270 (estándar) y m/z 291, 296 (estándar), respectivamente.

El valor endógeno de cada compuesto analizado se calculó mediante la fórmula que relaciona las áreas obtenidas para cada compuesto y su respectivo estándar. Dichas áreas se obtienen de las gráficas impresas para cada muestra; de esta manera se descuentan las pérdidas ocurridas a lo largo de la técnica de extracción y purificación.



Extracción, purificación y cuantificación de ME-JA

200 mg de PS de tejido se homogeneizó en mortero con nitrógeno líquido y 10 ml de MeOH. A la mezcla se le adicionó 10 µl de JA estándar (100 ng de D₆-JA). Posteriormente se realizó una segunda homogeneización en ultra turrax y se filtró a fin de obtener el sobrenadante. Se procedió a pasar el sobrenadante (10 ml de MeOH como máximo volumen) por mini-columna DEAE-Sephadex A-25. Se agregaron 10 ml de MeOH 100% y se descartó. Se adicionó la muestra (máximo 10 ml de MeOH) en la columna, se eluyó con 3 ml de MeOH 100% y se recolectó esta fracción.

Se adicionó 10 µl de JA estándar (100 ng de D₆-JA) y saponificó con 5 ml NaOH 1N (pH básico) para separar el grupo metílico de JA. Se dejó una noche en reposo a temperatura ambiente y posteriormente se acidificó con HCl 4N hasta alcanzar pH 3.

Se realizaron tres extracciones consecutivas con cloroformo utilizando una solución H₂O (bidestilada)-cloroformo (1:1, v/v) y se dejó reposar hasta la formación de dos fases. Se extrajo la fase inferior (cloroformo) y se agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar los restos de agua. Se colocó en un balón y se evaporó a sequedad hasta la eliminación del cloroformo.

La muestra se retomó con 5 ml de MeOH, se purificó en columna DEAE-Sephadex A-25 y se recolectó la fracción que contiene los compuestos ácidos, ya que JA se encuentra en su forma libre. Dicha fracción se evaporó a sequedad. Los análisis por HPLC y GC-MS se realizaron de igual manera que lo descrito anteriormente para JA, OPDA, 11-OH-JA y 12-OH-JA.

Extracción, purificación y estimación de ABA

La evaluación de ABA se llevó a cabo de acuerdo a protocolo de Luna y col. (1993). 200 mg de PS de material vegetal (semillas secas y embebidas) se homogeneizó en mortero con N₂ líquido y 20 ml de buffer imidazol (pH 7) como solvente de extracción. Se adicionó 2, 6-di-tert-butil-p-kresol (BHT) como antioxidante. Como estándar interno se agregó 50 ng de [²H₆]-ABA (OlChemIm Ltd, Olomouc, Czech Republic). La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C a fin de completar la extracción y permitir la estabilización del estándar. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se procedió a la evaporación de la fase isopropanol conservando la fase acuosa.



Mini-columna Amino (NH₂)

La purificación de la fase acuosa se realizó a través de una mini-columna de intercambio aniónico conteniendo sílica gel como soporte sólido (BAKERBOND speTM Amino (NH₂), Mallinckrodt Baker, Inc., USA), y previamente activada con MeOH 100%, agua deionizada y buffer imidazol 0.02 M. Se cargó la muestra en la columna y secuencialmente fue eluida con 6 ml de hexano e iguales cantidades de acetato de etilo y acetonitrilo. Estas fracciones fueron descartadas. Posteriormente se eluyó el ABA con una mezcla metanol-acético (95:5, v/v). Esta fracción se recolectó y llevó a sequedad en evaporador rotativo al vacío.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Los extractos secos se resuspendieron en 100 µl del solvente de corrida (MeOH-H₂O-AcOH, 70:30:0.1) y se partitionaron isocráticamente por HPLC (KNK-500, Konic Instruments) equipado con columna corta RP C₁₈ (µ-Bondapak, 300 x 3.9 mm i.d., 5-µm tamaño de partícula, Waters Associates, Milford, MA) y acoplado a un sistema UV-Visible con arreglo de diodo. Las muestras fueron eluidas con una mezcla isocrática de MeOH:H₂O:AcOH (70:30:0.1, v/v) a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. Las fracciones correspondientes a ABA puro (tiempo de retención: 2.77- 5.00 min.) fueron determinadas por UV a 262 nm. Dichas fracciones se recolectaron y evaporaron a sequedad.

Extracción y purificación de PA, DPA y ABA-GE

Los metabolitos de ABA, PA, DPA y ABA-GE fueron extraídos y purificados según protocolo modificado de Zhou y col. (2003). 200 mg de PS de material vegetal (semillas secas y embebidas) se homogeneizó en mortero con N₂ líquido y 3 ml de acetona-agua-ácido acético (80:19:1, v/v) como solvente de extracción. Se adicionaron 200 ng de cada uno de los estándares: (²H₃) PA, (²H₃) DPA y (²H₃) ABA-GE (NRC-Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, Canadá). La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C a fin de completar la extracción y permitir la estabilización de los estándares. Posteriormente los extractos fueron transferidos a tubos de 50 ml y centrifugados a 5000 rpm durante 15 min. Se colectó el sobrenadante y se evaporó a 35°C bajo vacío en SpeedVac. Los extractos secos se resuspendieron

en 100 μ l de la mezcla metanol-ácido acético (99:1, v/v). Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de jeringa y purificadas en columna BondElut-C18 (Varian, USA) a una velocidad de flujo menor a 1 ml min⁻¹. Estas columnas fueron previamente acondicionadas con 1.5 ml de metanol y equilibradas con 1.5 ml de metanol-agua-ácido acético (10:89:1, v/v). Las muestras (aproximadamente 1.5 ml) se cargaron en la columna y fueron lavadas con 1.5 ml de metanol-agua-ácido acético (10:89:1, v/v). Los metabolitos de ABA fueron eluidos con 1.5 ml de metanol-agua-ácido acético (80:19:1, v/v) y colectados en eppendorf de 2 ml. Estas fracciones se evaporaron bajo vacío en SpeedVac. Las muestras de PA, DPA y ABA-GE no requirieron purificación adicional por HPLC.

Identificación y cuantificación por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa-monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM)

Los extractos de las muestras conteniendo ABA o sus metabolitos se retomaron con dos lavados sucesivos de 500 μ l de MeOH 100% y se llevaron a sequedad al vacío. Luego se resuspendieron con 100 μ l de la solución de derivatización N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) y así convertidos a los derivados methylester-trimethylsilylether (MeTMSi). Las muestras fueron colocadas en estufa a una temperatura que aumentó desde 70 a 90 °C durante 30 min. Luego se inyectó 1 μ l de BSTFA en GC-MS-SIM (Hewlett Packard 5890 Series II GC, con interfase directa a 5972 Mass Selective Detector) equipado con una columna de 25 m Chrompack CPSil 19 (i.d. 0.25 mm; film thickness 0.22 μ M). Se utilizó gas helio como "carrier" a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. La temperatura inicial de la interfase fue mantenida a 100 °C por 1 min, continuando con un gradiente de 20 °C/min hasta 200 °C y 5 °C/min hasta 260 °C. La temperatura de inyección fue de 275 °C y la del detector de 280 °C. Para la cuantificación de ABA los iones 196 (deutero) y 190 (protio) fueron monitoreados entre 9-10 min; para PA, los iones 299 y 296 fueron monitoreados también a igual tiempo. Para DPA, los iones 297 y 294 fueron monitoreados entre 10-11 min y finalmente para ABA-GE, los iones 268 y 263 se monitorearon entre 11-12 min. A fin de realizar una determinación inequívoca se monitorearon los iones parentales correspondientes a cada compuesto para la confirmación de los picos respectivos (ABA 134, PA 279, DPA 281 y ABA-GE 430). Los valores endógenos de ABA, PA, DPA y ABA-

GE fueron calculados mediante la fórmula que relaciona el área obtenida y su respectivo estándar deuterado. Dichas áreas se obtienen de las gráficas impresas para cada muestra; de esta manera se descuentan las pérdidas ocurridas a lo largo de la técnica de extracción y purificación. Cada análisis se realizó por triplicado.

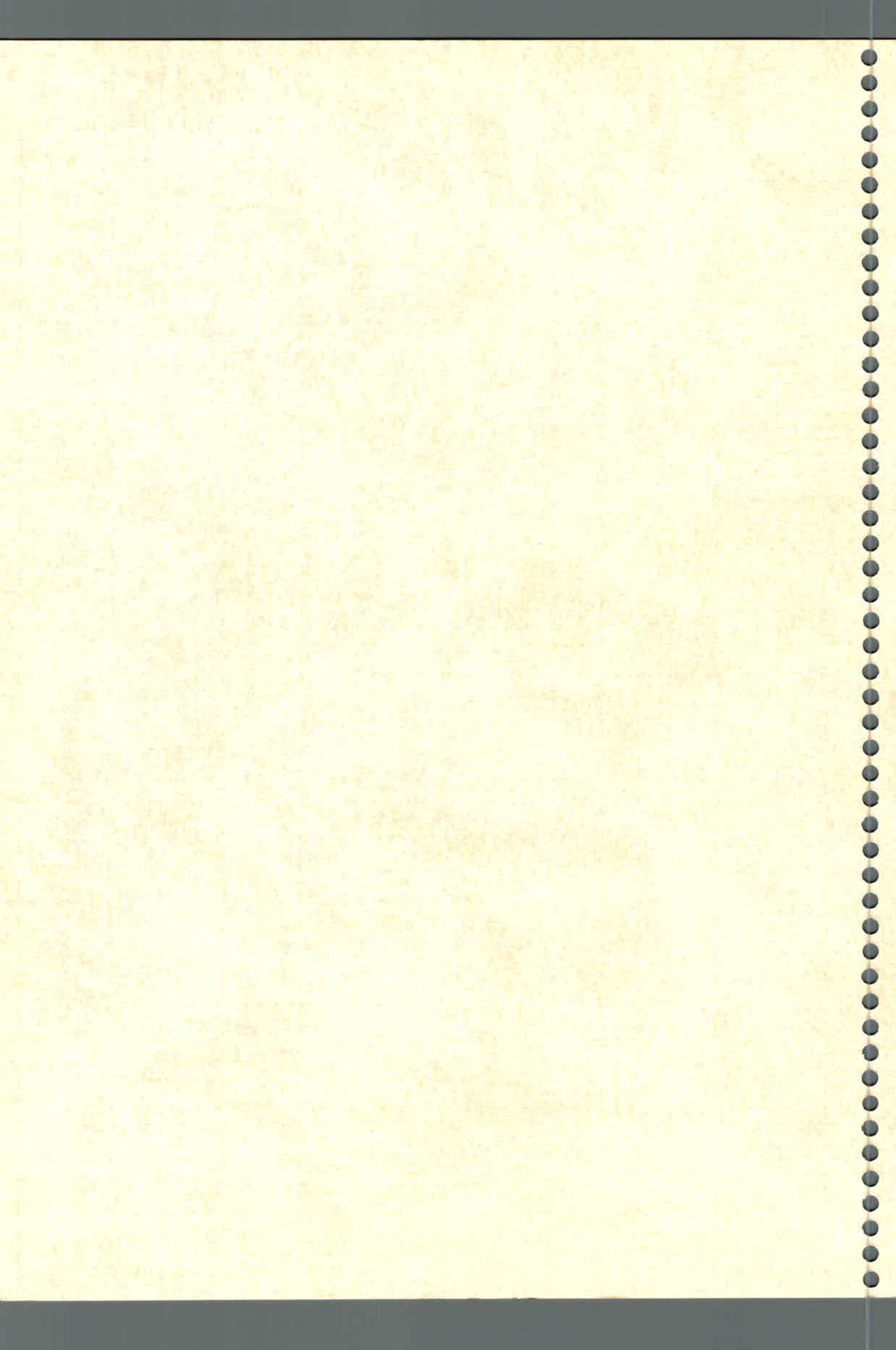
Los datos fueron expresados como la media \pm SE de tres determinaciones independientes correspondientes a tres muestras extraídas del tratamiento experimental (tiempo de imbibición). El análisis estadístico se realizó usando el programa Statgraphics Plus. El efecto de los diferentes tiempos de imbibición sobre las concentraciones endógenas de ABA y metabolitos fueron comparados mediante ANOVA de una vía, como se describió previamente en la sección "Condiciones de imbibición de las semillas".

Aplicación exógena de jasmonatos y ácido abscísico

Los tratamientos con JA, 11-OH-JA, 12-OH-JA y ABA exógenos se efectuaron utilizando 20 semillas wt colocadas en pequeños recipientes de vidrio a temperatura ambiente (25-27 °C). Las semillas se embebieron en 150 μ l de agua destilada (control) y en soluciones de JAs y ABA 10^{-4} M y 10^{-6} M, durante un período de 12, 24, 48 y 72 h. A las 24 y 48 h se adicionaron al medio 100 μ l de agua destilada a fin de mantener un buen nivel de humedad. El recuento final de germinación se realizó a las 72 h post-imbibición.



RESULTADOS



Resultados

Entre los miembros más comunes de la familia de los jasmonatos (JAs) se detectaron JA, su precursor OPDA, el derivado metilado ME-JA y las formas hidroxiladas 11-OH-JA y 12-OH-JA tanto en semillas como en plántulas de tomate del cv. Moneymaker y de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* (Fig. 8).

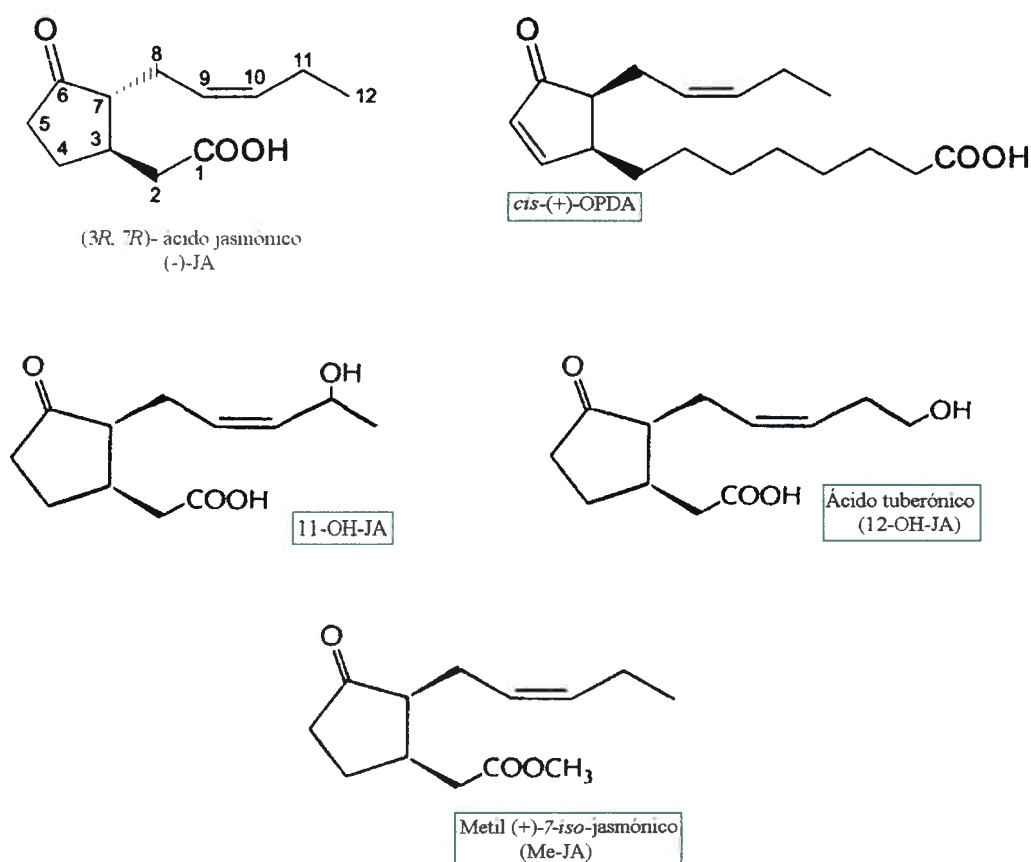
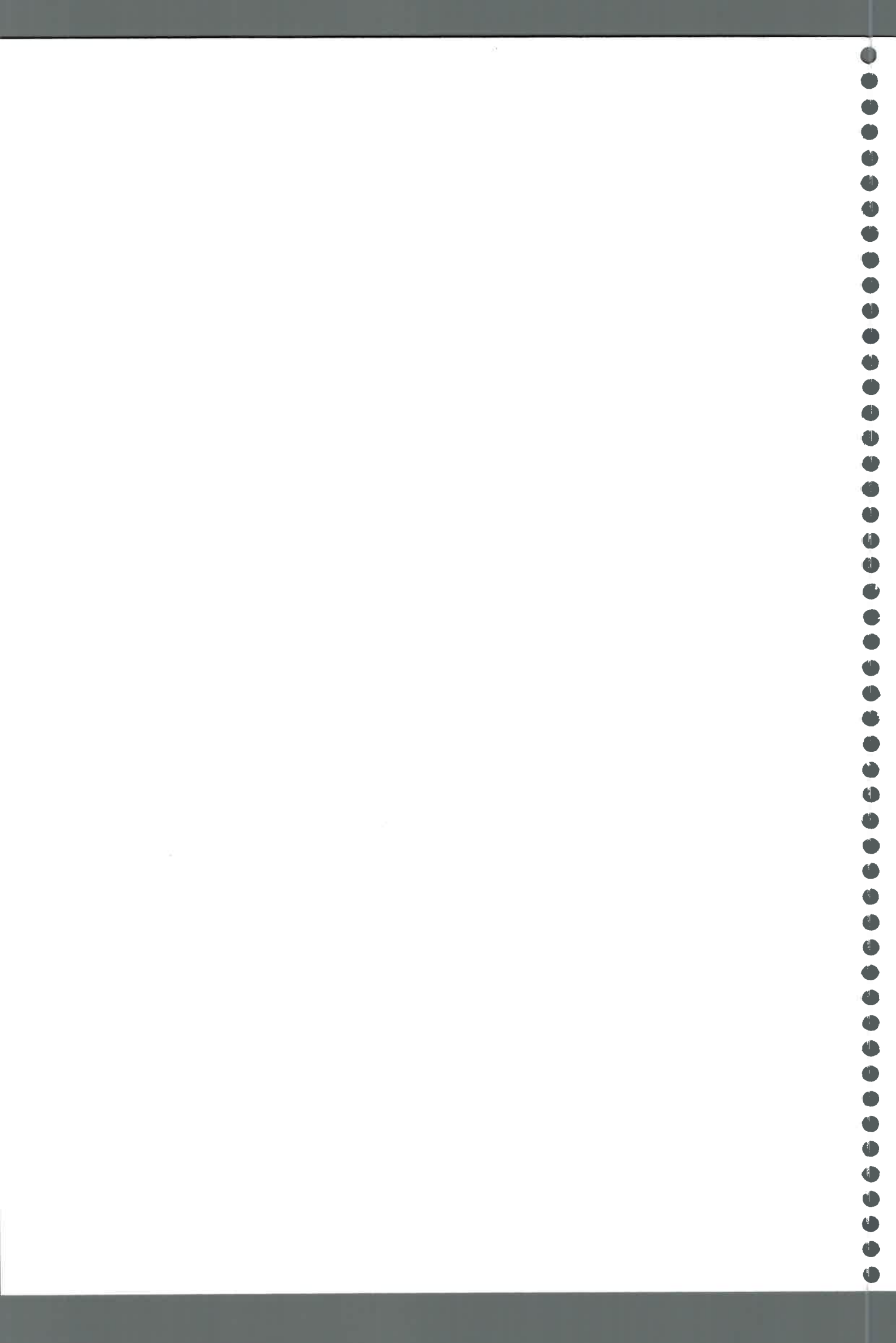


Fig. 8. Estructura química de los compuestos aislados e identificados en semillas y plántulas del cv. Moneymaker y sus respectivos mutantes.

Contenido endógeno de jasmonatos en semillas secas

En las Fig. 9A, B y C se resumen los resultados de los niveles basales en semillas secas del cv. Moneymaker (wt) y de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1*. Las diferencias más relevantes se encontraron en el contenido de las formas hidroxiladas 11-OH-JA y 12-OH-JA.



Las semillas del wt mostraron un contenido significativamente más elevado de ambos compuestos comparado con los mutantes. El mutante *tss1* no presentó diferencias significativas en el contenido de JA, OPDA y ME-JA respecto al wt (Fig. 9A). En el wt y en *tss1* el nivel más bajo registrado para estos compuestos fue el de JA, siguiendo en orden creciente OPDA y ME-JA. Estos resultados evidencian que *tss1* presenta niveles disminuidos de todos los miembros de la familia de JAs analizados.

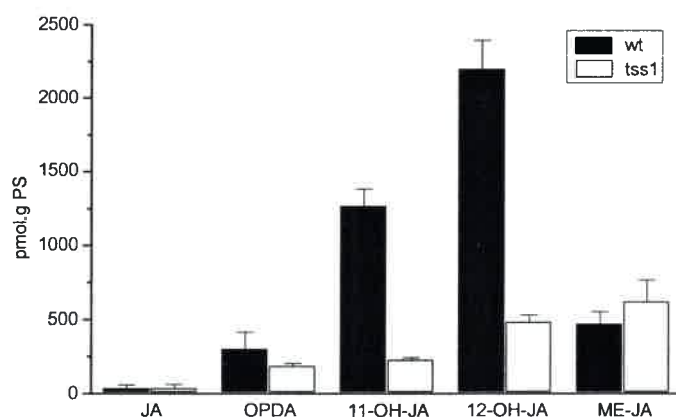
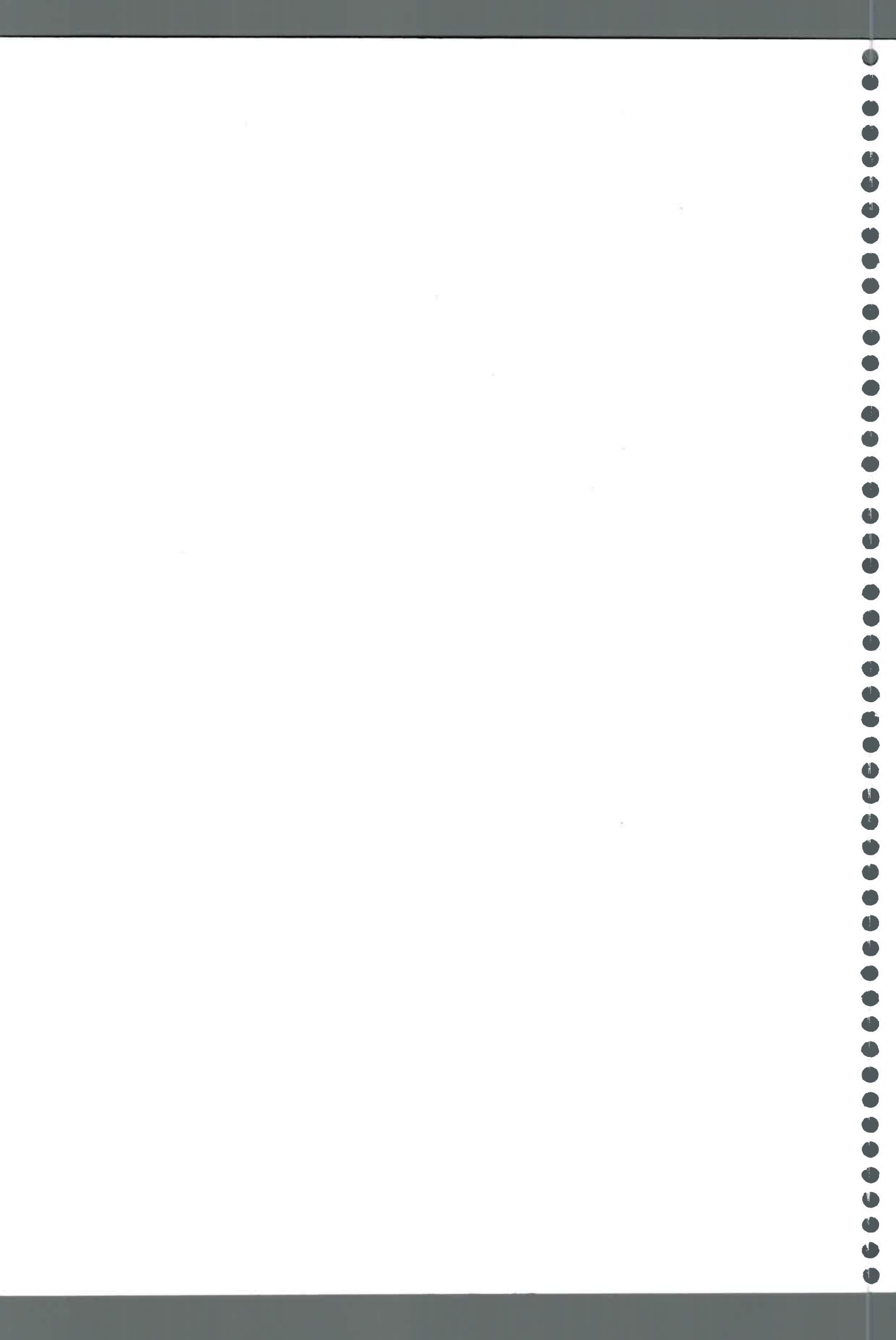


Fig. 9A. Niveles basales de jasmonatos (pmol.g⁻¹ PS) en semillas secas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* (n=3 ± SE) p<0.05.

El mutante *tss2* también presentó niveles más bajos de JAs que el wt; sin embargo el contenido de JA, OPDA y de ambos hidroxilados fue levemente superior al del mutante *tss1* (Fig. 9B). Asimismo, las diferencias entre el wt y *tss2* fueron similares a las establecidas entre el wt y *tss1*. Cabe señalar que ME-JA no modificó sus valores en los mutantes respecto al wt.



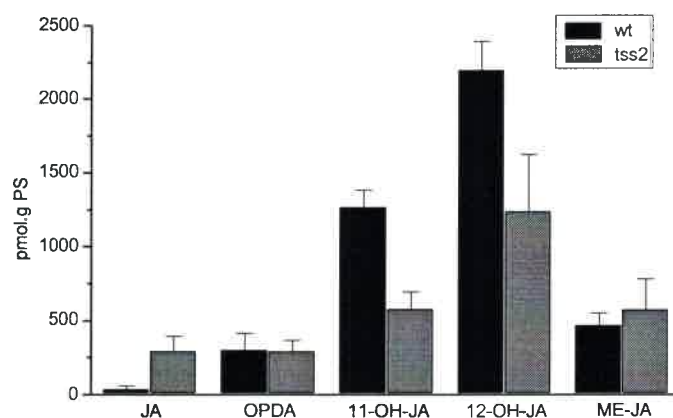


Fig. 9B. Niveles basales de jasmonatos (pmol.g^{-1} PS) en semillas secas del cv. Moneymaker y del mutante *tss2* ($n=3 \pm \text{SE}$) $p<0.05$.

En la Fig. 9C se observa que el contenido basal de JAs en el mutante *tos1* es también menor que el del wt. Además, el patrón endógeno de los compuestos analizados en *tos1* fue similar al del mutante *tss2*.

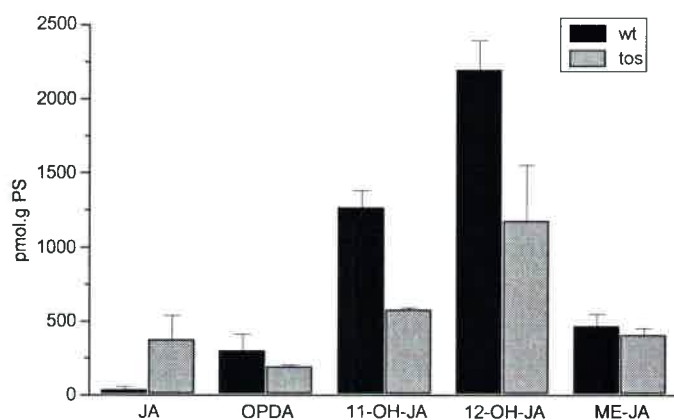


Fig. 9C. Niveles basales de jasmonatos (pmol.g^{-1} PS) en semillas secas del cv. Moneymaker y del mutante *tos1* ($n=3 \pm \text{SE}$) $p<0.05$.

En general, el derivado 12-OH-JA fue el compuesto mayoritario en semillas secas del wt y de los mutantes; mientras que el contenido endógeno de JA y OPDA fue menor que el de las formas hidroxiladas, tanto en el wt como en los mutantes.

Entre los tres mutantes, *tos1* fue el que presentó un mayor nivel de JA, el cual fue significativo respecto al del wt.

Por otra parte, ME-JA no varió de manera significativa entre el wt y los mutantes.

Considerando los tres mutantes analizados, los menores niveles endógenos de JAs se observaron en el mutante *tss1* caracterizado como hipersensible a estrés iónico (Borsani y col. 2001).

Contenido endógeno de jasmonatos en semillas embebidas y agua de imbibición

A fin de estudiar los cambios en los niveles de JAs durante el transcurso del tiempo de imbibición de las semillas y detectar si los mismos podrían ser eventualmente eluidos al agua de imbibición, se procedió a analizar la presencia de tales compuestos en semillas embebidas y en el agua donde se colocaron las semillas del wt y del mutante *tss1*.

En la Fig. 10A se informan los resultados de la evaluación de JAs durante el tiempo de imbibición de las semillas.

Las semillas embebidas del wt incrementaron de manera muy leve el nivel de JA a las 12 h posteriores a la imbibición, manteniéndose estable hasta las 48 h. En el mutante *tss1* un leve incremento de este compuesto fue observado a las 24 h, y esta variación fue estadísticamente significativa (Fig. 10A).

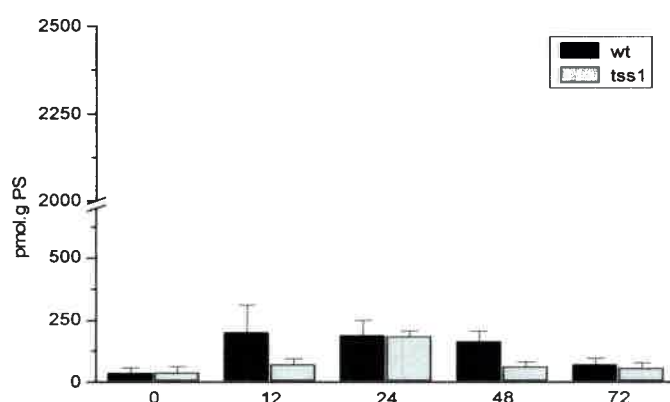


Fig. 10A. Niveles de JA (pmol.g⁻¹ PS) en semillas embebidas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* (n=3 ± SE) p<0.05.

En el wt la cuantificación del precursor OPDA reveló un aumento leve y transitorio en sus niveles basales a las 48 h; por el contrario, un aumento sostenido aunque también leve de este compuesto, a partir de las 12 h posteriores a la imbibición de las semillas, se observó en *tss1* (Fig. 10B).

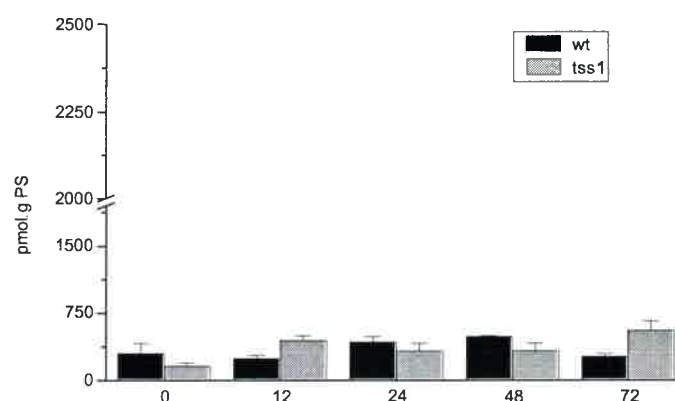


Fig. 10B. Niveles de OPDA (pmol.g^{-1} PS) en semillas embebidas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* ($n=3 \pm \text{SE}$) $p<0.05$.

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de los derivados hidroxilados indican que el contenido endógeno de 11-OH-JA en semillas del wt se mantuvo más elevado que en semillas de *tss1* hasta las 48 h, para luego decrecer abruptamente a las 72 h hasta alcanzar el mismo nivel del mutante. Por su parte, las semillas de *tss1* mantuvieron un nivel bajo de 11-OH-JA durante el curso de la imbibición (Fig. 10C).

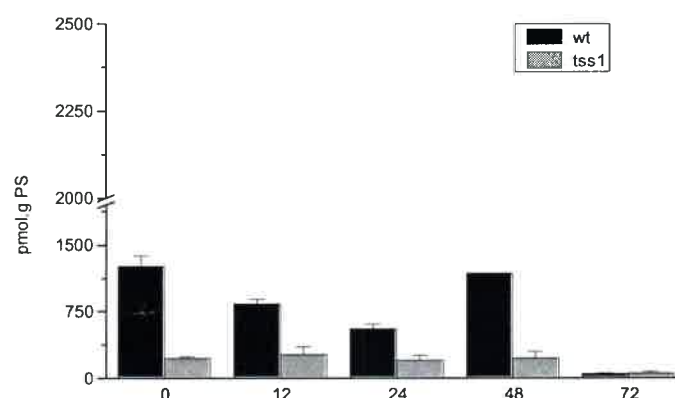
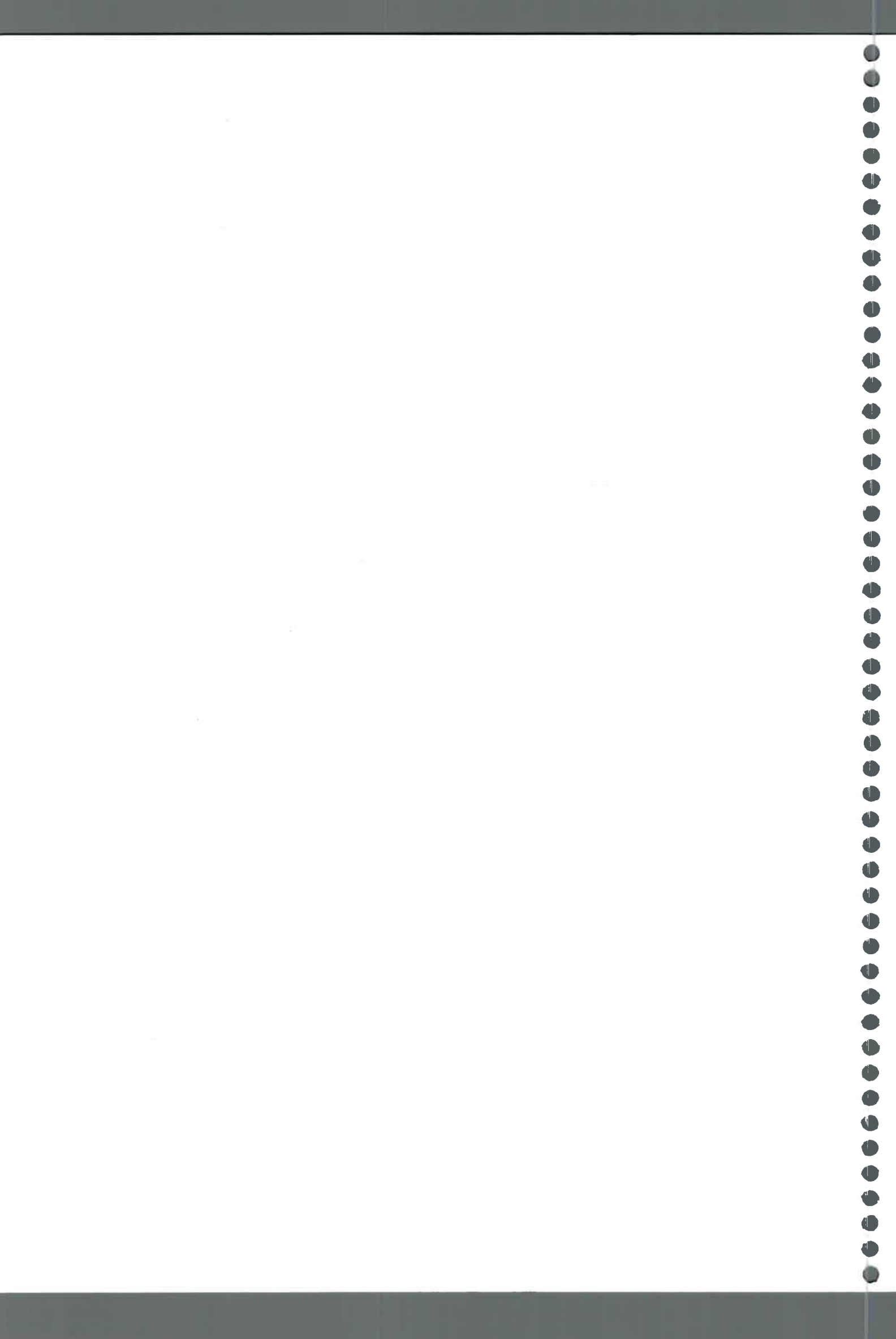


Fig. 10C. Niveles de 11-OH-JA (pmol.g^{-1} PS) en semillas embebidas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* ($n=3 \pm \text{SE}$) $p<0.05$.



La forma hidroxilada 12-OH-JA presentó una tendencia diferente con respecto al derivado 11-OH-JA durante el curso de la imbibición. En el wt los niveles endógenos de 12-OH-JA fueron significativamente elevados al inicio del experimento, disminuyendo gradualmente con el tiempo de imbibición.

En el mutante *tss1*, los niveles de 12-OH-JA fueron bajos al comienzo del experimento mostrando un incremento importante entre las 12 y 48 h posteriores a la imbibición. Finalmente, una considerable disminución a las 72 h se observó tanto en el wt como en *tss1* (Fig. 10D).

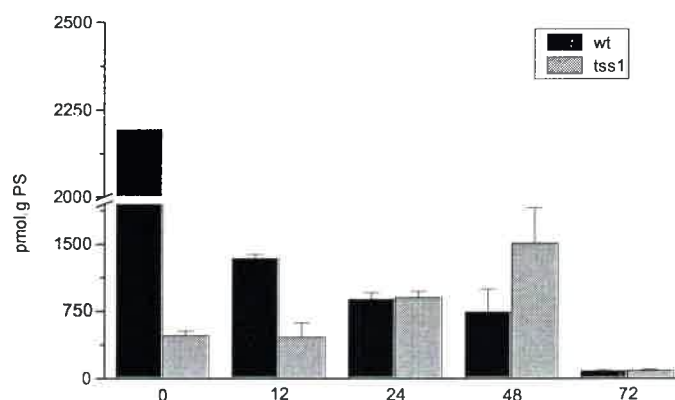


Fig. 10D. Niveles de 12-OH-JA (pmol . g⁻¹ PS) en semillas embebidas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* (n=3 ± SE) p<0.05.

La cuantificación de JAs en el agua de imbibición de las semillas del wt y del mutante *tss1* mostró que estos compuestos pueden ser secretados desde las semillas a la fase líquida.

Entre los JAs analizados, JA fue el que se encontró en menor proporción en el agua de imbibición con una muy escasa liberación a las 24 h en el wt y en el mutante en estudio (Fig. 11A).

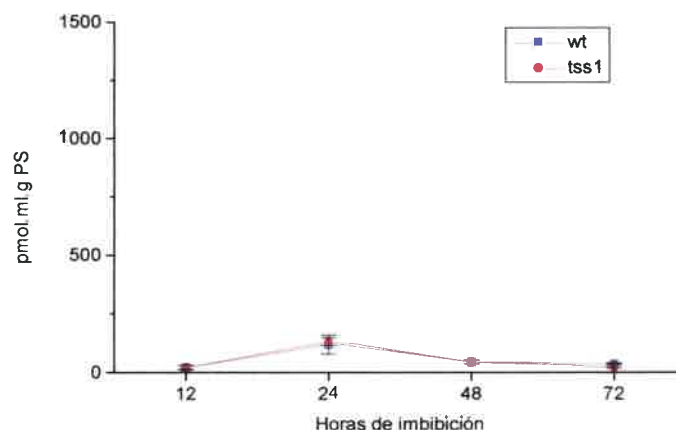


Fig. 11A. Niveles de JA en el agua de imbibición de semillas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* ($n=3 \pm SE$) $p<0.05$.

Respecto a OPDA, se registró la misma tendencia en el wt y en *tss1* en cuanto a su liberación durante el curso de la imbibición. A las 24 h se observó la mayor secreción de OPDA; no obstante, este incremento fue superior en el mutante (Fig. 11B).

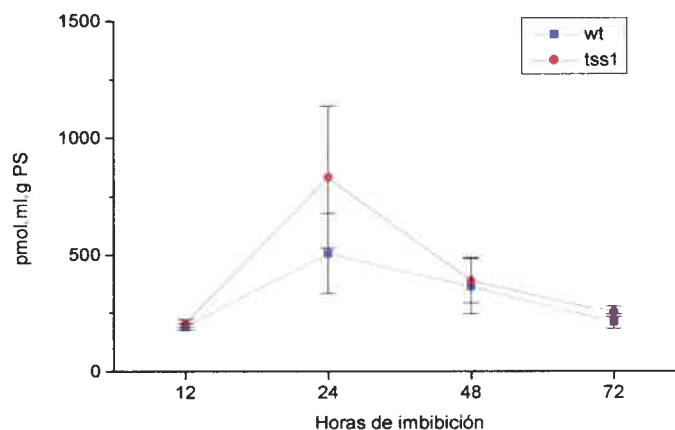


Fig. 11B. Niveles de OPDA en el agua de imbibición de semillas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* ($n=3 \pm SE$) $p<0.05$.

Como se indica en la Fig. 11C, la liberación de 11-OH-JA disminuyó significativamente en el wt a las 48 h, con un posterior aumento a las 72 h. Las semillas del mutante *tss1* mostraron una marcada liberación de este hidroxilado a las 24 h manteniendo luego un nivel estable.



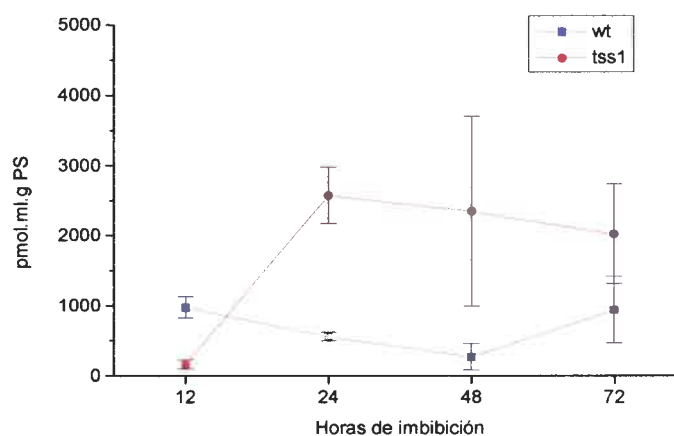


Fig. 11C. Niveles de 11-OH-JA en el agua de imbibición de semillas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* ($n = 3 \pm SE$) $p < 0.05$.

En la Fig. 11D se observa que la forma hidroxilada 12-OH-JA presentó una dinámica diferente en el agua de imbibición de las semillas del wt respecto al mutante *tss1*. La liberación de este compuesto fue superior en el wt que en *tss1* durante el curso de la imbibición.

En el wt el nivel de 12-OH-JA incrementó significativamente a las 24 h para disminuir abruptamente a las 48 h. De igual modo, en *tss1* la concentración de dicho compuesto también presentó una reducción importante a las 48 h; aunque a las 72 h alcanzó aproximadamente el mismo valor del wt (Fig 11D).

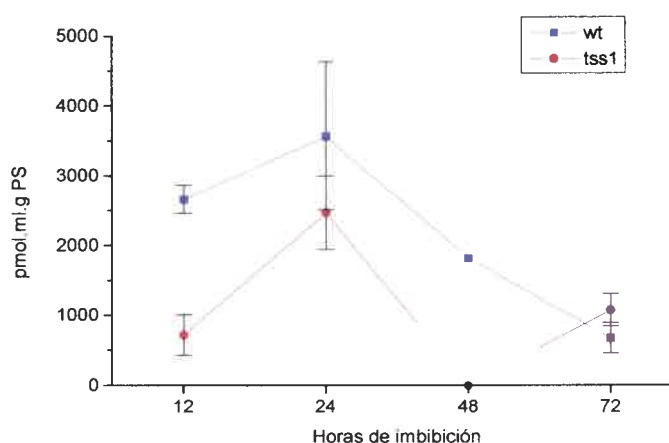


Fig. 11D. Niveles de 12-OH-JA en el agua de imbibición de semillas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* ($n=3 \pm SE$) $p < 0.05$. En el cv. Moneymaker el dato a las 48 corresponde a $n=1$.



Estos resultados demuestran que las semillas del wt así como las de *tss1* secretaron mayoritariamente los derivados hidroxilados al agua de imbibición; por el contrario, JA fue el compuesto liberado en menor proporción.

Contenido total de hidroxilados en semillas embebidas + agua de imbibición

Puesto que 11-OH-JA y 12-OH-JA fueron los compuestos más abundantes, el valor de su concentración en semillas embebidas se adicionó al valor encontrado en el agua de imbibición (Fig. 12).

Los resultados muestran que en el wt 11-OH-JA mantiene un nivel relativamente estable; mientras que en el mutante se registró un aumento significativo de este compuesto entre las 12 y 24 h, para luego estabilizarse entre las 24 y 72 h. En el wt la concentración de 12-OH-JA fue superior a la del mutante; de todos modos la tendencia fue similar a la de *tss1*, con un aumento significativo a las 24 h y abrupta disminución a las 72 h.

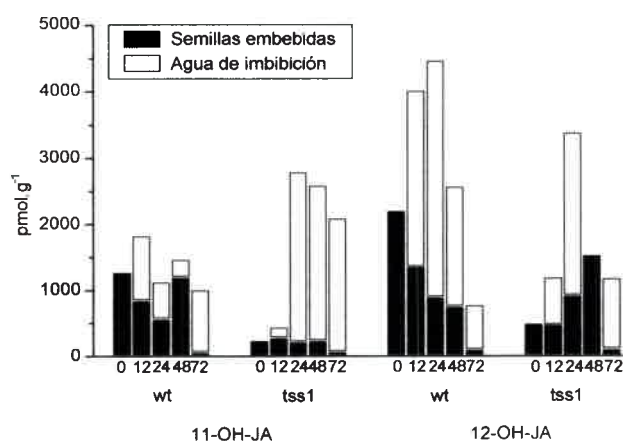


Fig. 12. Dinámica del contenido de 11-OH-JA y 12-OH-JA en semillas embebidas + agua de imbibición del cv. Moneymaker y del mutante *tss1*.

Contenido endógeno de jasmonatos en plántulas controles

El análisis de los niveles basales de JAs en plántulas control indican que las diferencias significativas se encontraron en el precursor OPDA y en ambas formas hidroxiladas (Fig. 13).



Las plántulas *tos1* presentaron mayores niveles endógenos de OPDA y de 12-OH-JA respecto al wt y a los mutantes *tss1* y *tss2*; mientras que altos niveles de la forma 11-OH-JA fueron observados en los mutantes *tss2* y *tos1*.

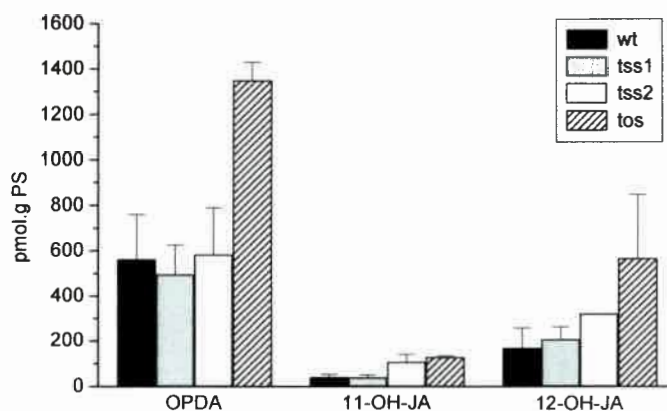


Fig. 13. Contenido endógeno de OPDA, 11-OH-JA y 12-OH-JA en plántulas controles del cv. Moneymaker y de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

Contenido endógeno de jasmonatos en semillas secas y plántulas controles

Las plántulas del wt mostraron un nivel levemente más alto aunque significativo de JA que las semillas secas. El contenido de OPDA fue mayor que el de JA, sin embargo no hubo diferencia significativa entre semillas y plántulas. Por el contrario, el nivel de los derivados de JA fue marcadamente inferior en plántulas; con una reducción de 32 veces en el contenido de 11-OH-JA en plántulas respecto a semillas, de 13 veces para 12-OH-JA y de sólo 4 veces para ME-JA (Fig. 14A).



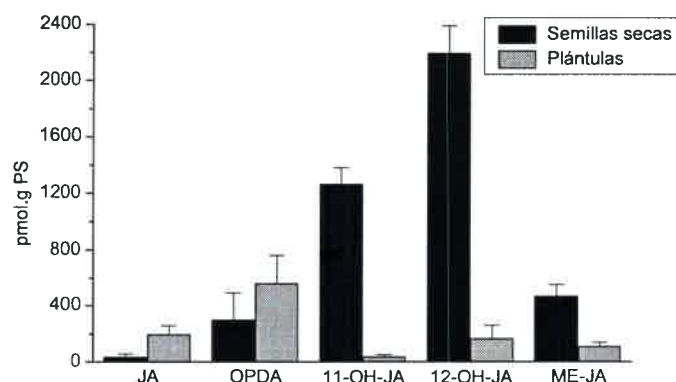


Fig. 14A. Niveles endógenos de jasmonatos en semillas secas y plántulas controles del cv. Moneymaker ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

En la Fig. 14B se observa que las plántulas de *tss1* también mostraron niveles de JA y OPDA levemente mayores, aunque significativamente superiores al de semillas secas. Asimismo, el contenido de los derivados de JA fue menor en plántulas que en semillas; sin embargo esta reducción no fue tan importante como la observada en el wt. El contenido de 11-OH-JA fue 6 veces menor, el de 12-OH-JA 2 veces menor y el de ME-JA 4 veces menor en plántulas que en semillas (Fig. 14B).

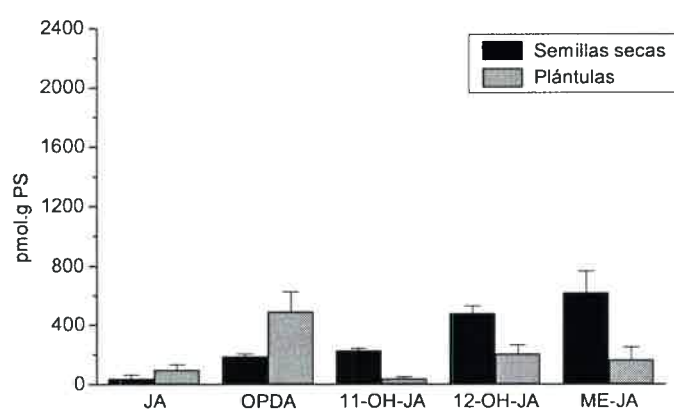


Fig. 14B. Niveles endógenos de jasmonatos en semillas secas y plántulas controles del mutante *tss1* ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

En el caso del mutante *tss2* (Fig. 14C), el único compuesto que mostró un nivel más alto en plántulas que en semillas fue OPDA. Las formas derivadas de JA disminuyeron en plántulas con respecto a semillas.



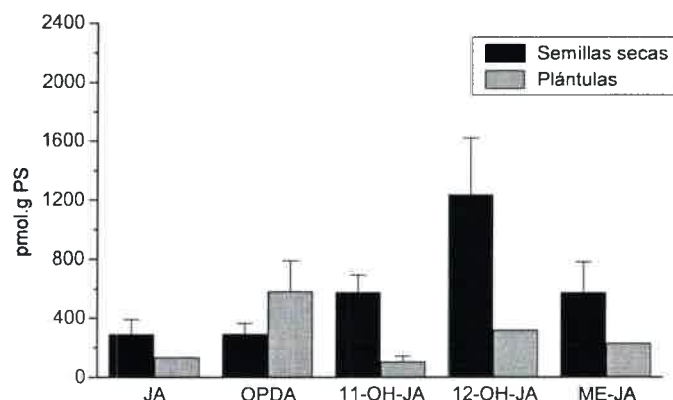


Fig. 7C. Niveles endógenos de jasmonatos en semillas secas y plántulas controles del mutante *tss2* ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

Una tendencia similar a *tss2* se observó en plántulas del mutante *tos1*, con un aumento significativo de OPDA de 7 veces en plántulas respecto a semillas, y una disminución en los restantes compuestos (Fig. 14D).

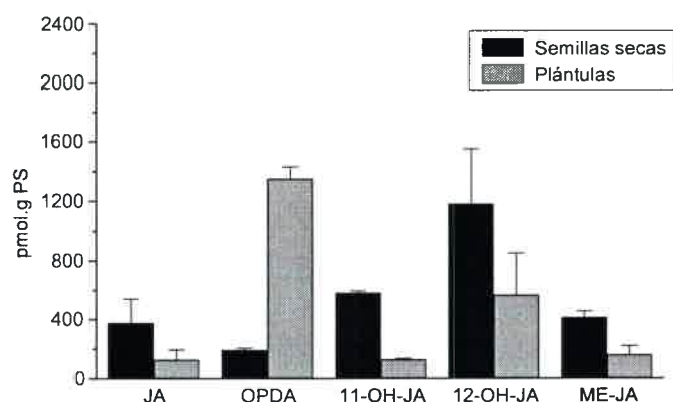


Fig. 14D. Niveles endógenos de jasmonatos en semillas secas y plántulas controles del mutante *tos1* ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

En la Fig. 15 se resumen los resultados del contenido de JAs presente en semillas secas, en semillas embebidas por 72 h y en plántulas controles del wt y del mutante *tss1*. Los derivados hidroxilados fueron los compuestos más abundantes en semillas secas del wt así como del *tss1*, aunque el mutante presentó niveles basales más bajos que los del wt.



Con el curso de la imbibición y posterior crecimiento de la plántula, el umbral de 11-OH-JA sufrió una dramática reducción en el wt y una menor reducción en *tss1*; una tendencia similar fue observada para 12-OH-JA.

Asimismo se observó una reducción del contenido de ME-JA en semillas secas respecto a plántulas del wt y del mutante.

En contraposición a lo mencionado, JA y OPDA mostraron una tendencia creciente de sus niveles a partir de semilla seca, período de imbibición, hasta estadio de plántula.

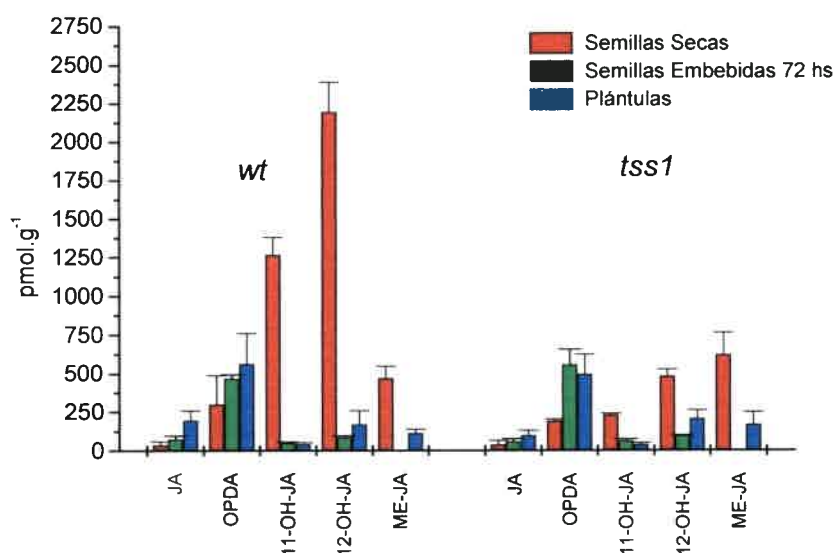


Fig. 15. Dinámica de JAs en semillas secas, embebidas por 72 h y plántulas controles del cv. Moneymaker y del mutante *tss1* ($n = 4 \pm SE$) $p < 0.05$.

Contenido endógeno de jasmonatos en plántulas tratadas con NaCl

Debido a que la intervención de ABA en la tolerancia a estrés en plantas en estado vegetativo ha sido ampliamente documentada, en este trabajo sólo se analiza la modificación de los niveles de JAs en plántulas sometidas a estrés abiótico.

En la Fig. 16 se muestran los cambios en el nivel de JAs cuando plántulas wt y mutantes fueron sometidas a estrés por NaCl.



En las plántulas wt, un incremento significativo de 12-OH-JA se observó en respuesta al tratamiento salino; el resto de los compuestos no se modificó por efecto del estrés (Fig. 16A).

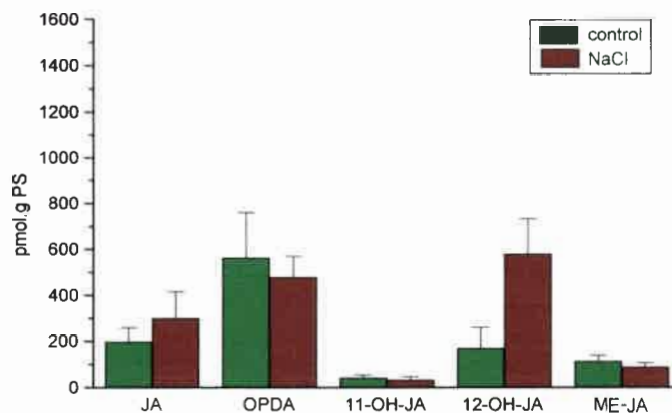


Fig. 16A. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del cv. Moneymaker, controles y tratadas con NaCl ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

Las plántulas *tss1* tratadas con NaCl sólo mostraron un leve incremento significativo de JA por efecto del estrés; los restantes compuestos no sufrieron modificaciones (Fig. 16B).

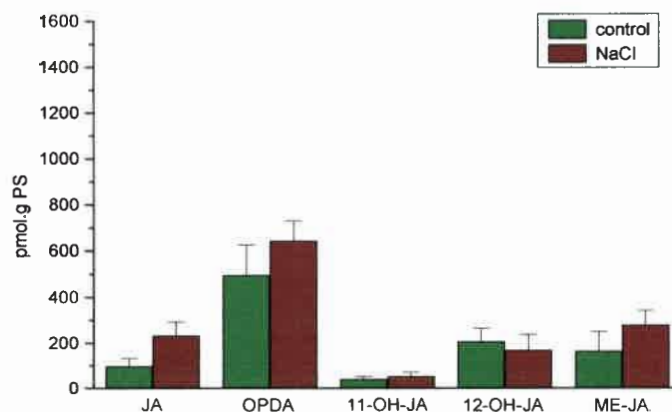


Fig. 16B. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del mutante *tss1*, controles y tratadas con NaCl ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.



Por otra parte, el tratamiento salino aplicado a plántulas *tss2* produjo una leve disminución, aunque significativa, en los derivados 11-OH-JA y ME-JA (Fig. 16C).

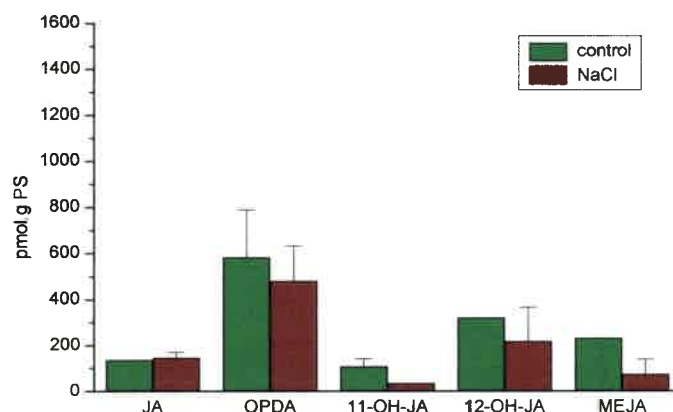


Fig. 16C. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del mutante *tss2*, controles y tratadas con NaCl ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

Finalmente, tal como se muestra en la Fig. 16D, las plántulas del mutante *tos1* mostraron una disminución significativa en los niveles basales de OPDA, 11-OH-JA, 12-OH-JA y ME-JA luego del tratamiento con NaCl. Cabe señalar que la mayor disminución por efecto de la sal fue observada en el precursor OPDA y en el derivado 12-OH-JA.

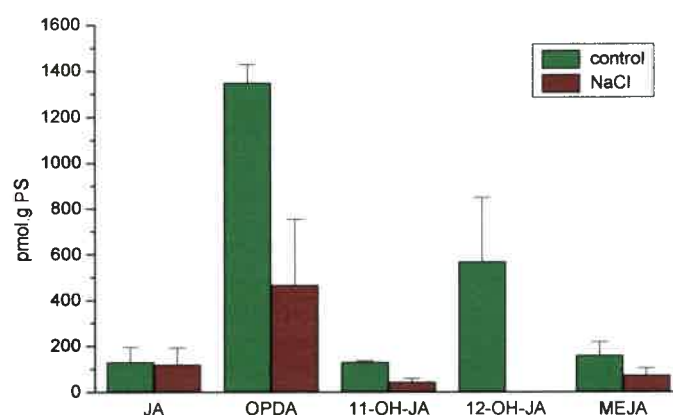


Fig. 16D. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del mutante *tos1*, controles y tratadas con NaCl ($n=4 \pm SE$) $p<0.05$.

Un hallazgo interesante que merece ser mencionado es la aparición de un nuevo compuesto, el derivado octadecanoico 10-oxofitodienoico (10-OPDA) en semillas secas y embebidas del cv. Moneymaker y del mutante *tss1*. El análisis de los cromatogramas obtenidos por GC-MS con este material vegetal reveló la



presencia de este compuesto, el que se origina a partir de α -LA a través de la vía 9-LOX, mediante la acción de una enzima OPR3 la cual produce un reordenamiento químico por carencia de una AOC dando un óxido de aleno.

Contenido endógeno de jasmonatos en plántulas tratadas con manitol

Las modificaciones detectadas en los niveles endógenos de JAs en plántulas wt y mutantes sometidas a estrés osmótico por manitol se muestran en Fig. 17 A, B, C y D.

En las plántulas wt se registró un aumento significativo del precursor OPDA en respuesta a manitol; mientras que el resto de los compuestos no se modificó por efecto del estrés osmótico (Fig. 17A).

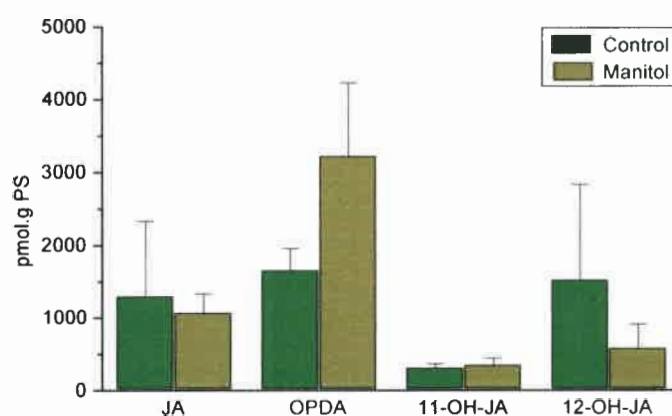


Fig. 17A. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del cv. Moneymaker, controles y tratadas con manitol ($n=5 \pm SE$) $p<0.05$.

Contrariamente a lo que ocurre en el wt, las plántulas del mutante *tss1* no respondieron al tratamiento con manitol, ya que no se evidenciaron diferencias significativas entre controles y estresadas (Fig. 17B).



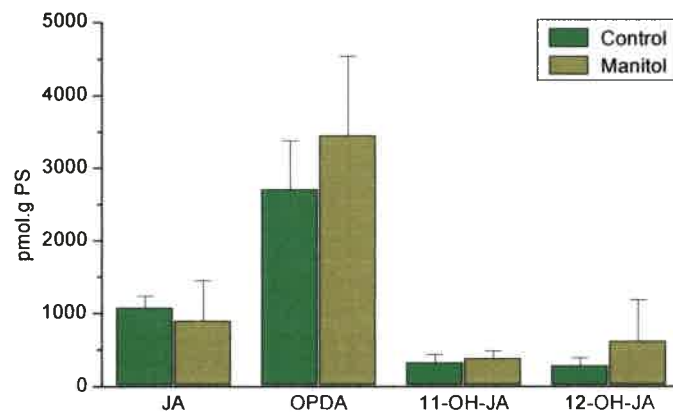


Fig. 17B. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del mutante *tss1*, controles y tratadas con manitol ($n=5 \pm SE$) $p<0.05$.

Las plántulas del mutante *tss2* mostraron un leve aunque significativo incremento en 11-OH-JA, mientras que para 12-OH-JA se observó una marcada respuesta a manitol (Fig. 17C).

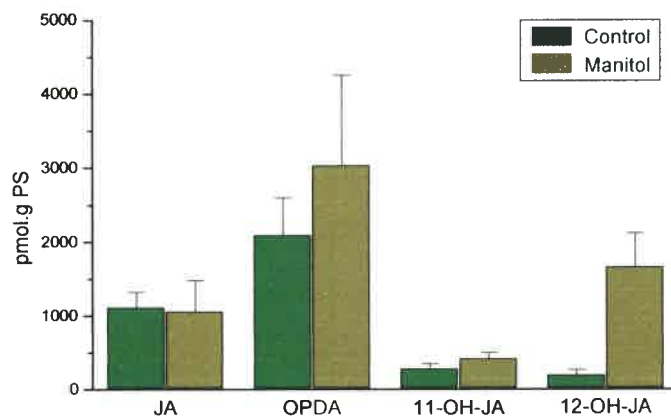


Fig. 17C. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del mutante *tss2*, controles y tratadas con manitol ($n=5 \pm SE$) $p<0.05$.

Al igual que lo sucedido con *tss1*, las plántulas *tos1* no respondieron al tratamiento con manitol (Fig. 17D).



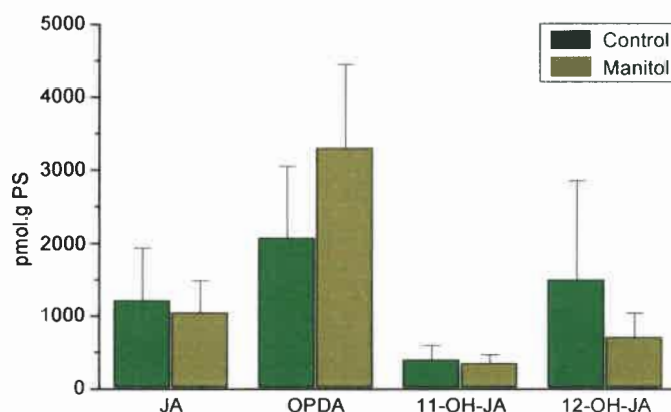


Fig. 17D. Niveles endógenos de jasmonatos en plántulas del mutante *tos1*, controles y tratadas con manitol ($n=5 \pm SE$) $p<0.05$.

Contenido endógeno de ABA y metabolitos en semillas secas

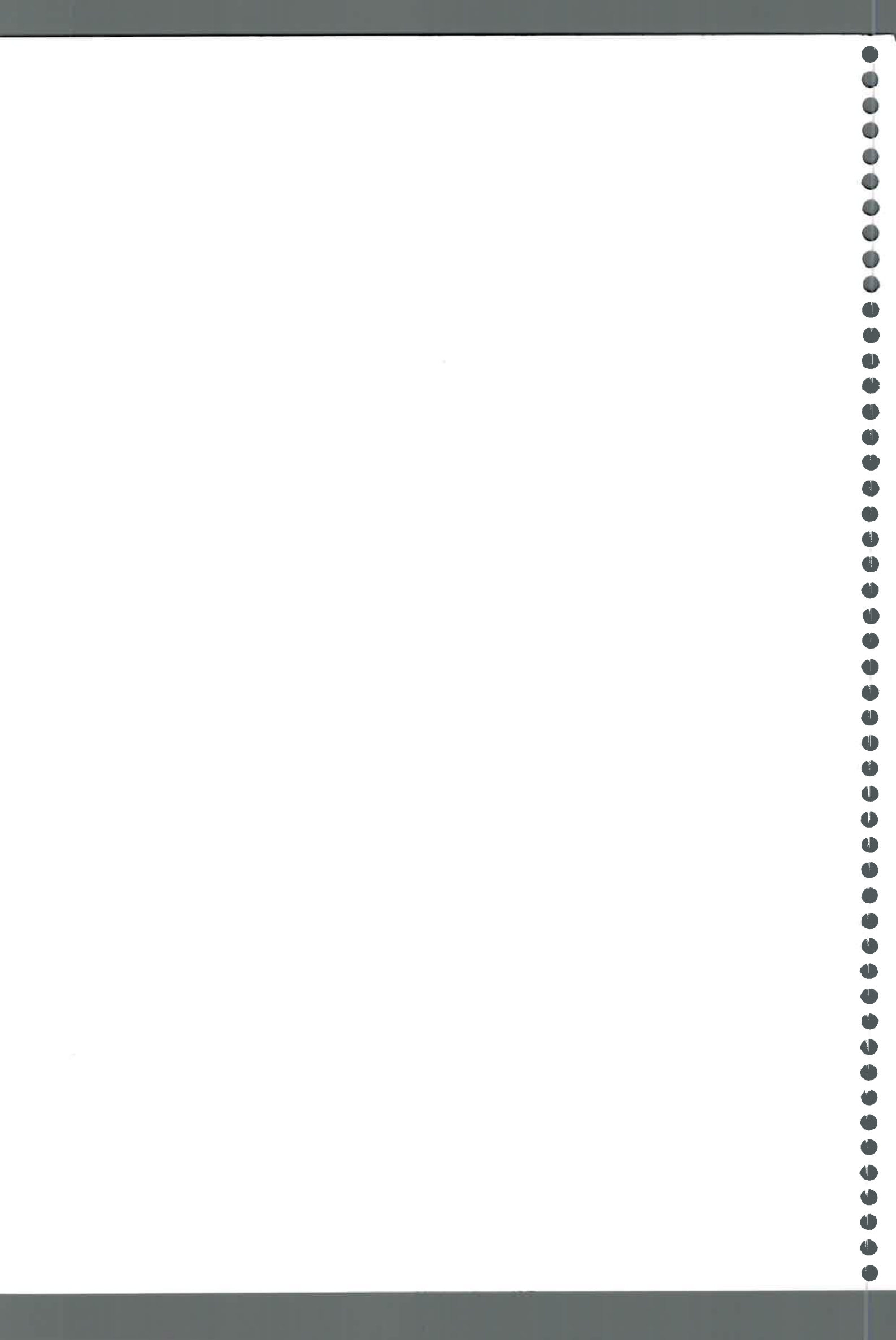
Los resultados de la evaluación del contenido endógeno de ABA, PA, DPA y ABA-GE en semillas secas del wt y de sus respectivos mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* se resumen en la Fig. 18. Se registraron diferencias significativas entre el nivel basal de ABA de las semillas wt y mutantes.

Las semillas wt mostraron un contenido significativamente más elevado de ABA ($49.873 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$), siguiendo en orden de magnitud el mutante *tss1* ($38.136 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$) y luego el mutante *tos1* ($20.763 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$). Por el contrario, el contenido más bajo de ABA correspondió al mutante *tss2* ($732 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$).

Los metabolitos de ABA, PA, DPA y ABA-GE fueron detectados en las semillas secas del wt y sus mutantes. Estos compuestos presentaron un patrón de distribución similar en los mutantes *tss2* y *tos1*, en los cuales PA fue el metabolito menos abundante.

No obstante, en todos los germoplasmas las concentraciones de los metabolitos fueron inferiores a los niveles de ABA. En el wt, la cantidad total de metabolitos ($\text{PA} + \text{DPA} + \text{ABA-GE} = 1.149 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$) fue aproximadamente 83 veces menor al total de ABA (Fig. 18A).

Similarmente, en *tss1* el contenido total de metabolitos fue 84 veces más bajo que el de ABA, mientras que en el mutante *tos1* los metabolitos sólo fueron 37 veces inferiores al contenido de ABA (Fig. 18B y D).



Por el contrario, el mutante *tss2* presentó una leve diferencia entre niveles de ABA y contenido total de metabolitos ($650 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$) (Fig. 18C).

DPA fue el metabolito más abundante en todos los germoplasmas, y su contenido fue superior en el wt comparado con los mutantes. Entre los mutantes, *tss2* presentó el contenido más elevado de DPA ($435 \text{ pmol.g}^{-1} \text{ PS}$); *tss1* y *tos1* mostraron un contenido similarmente más bajo de este metabolito. PA fue un compuesto minoritario en el wt y en los mutantes. El contenido de ABA glucosil-éster fue dos veces superior en el wt respecto a los mutantes.

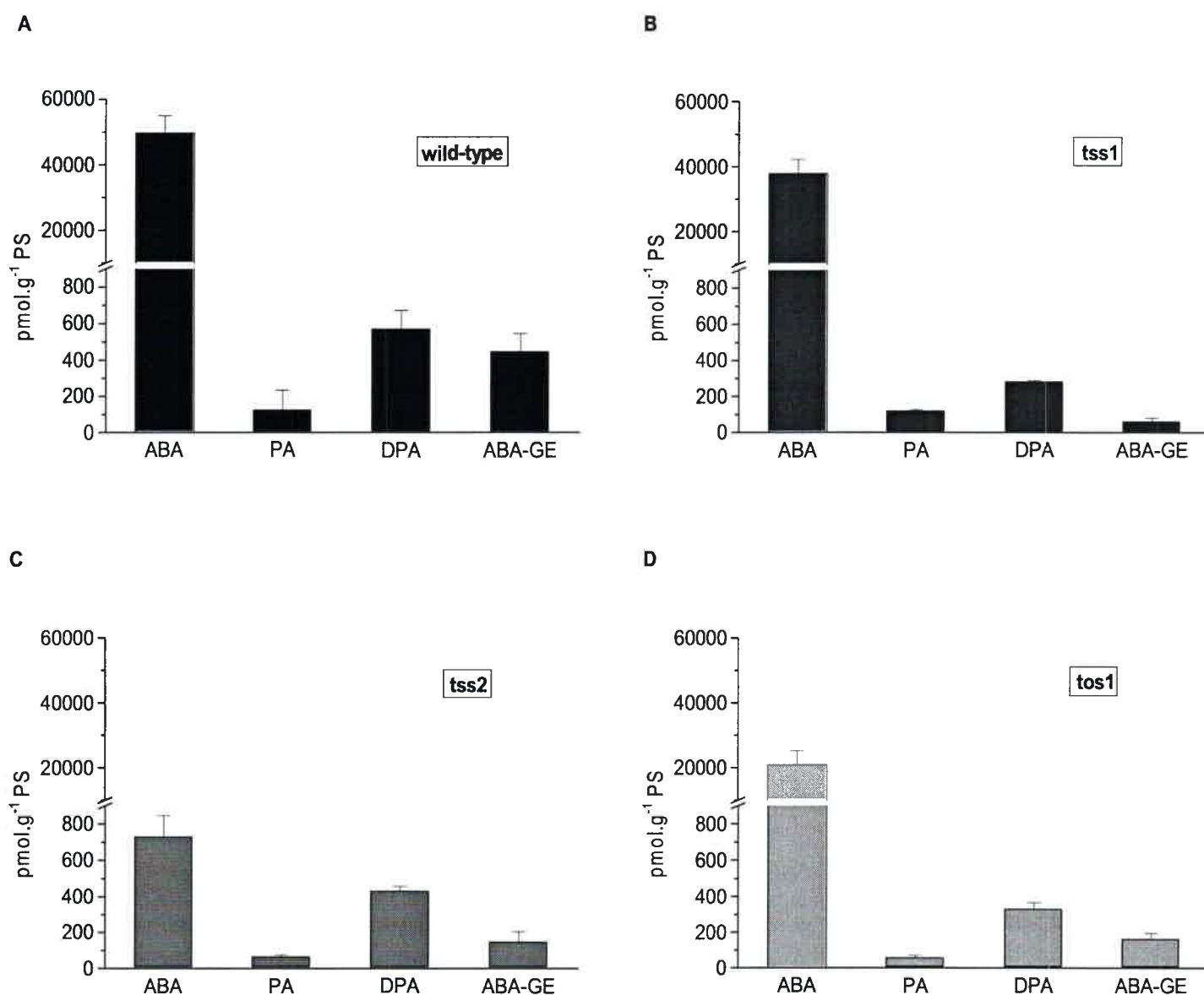


Fig. 18. Contenido endógeno de ABA y metabolitos en semillas secas. **A.** cv. Moneymaker; **B.** mutante *tss1*; **C.** mutante *tss2*; **D.** mutante *tos1* ($n=3$, $P < 0.05$).



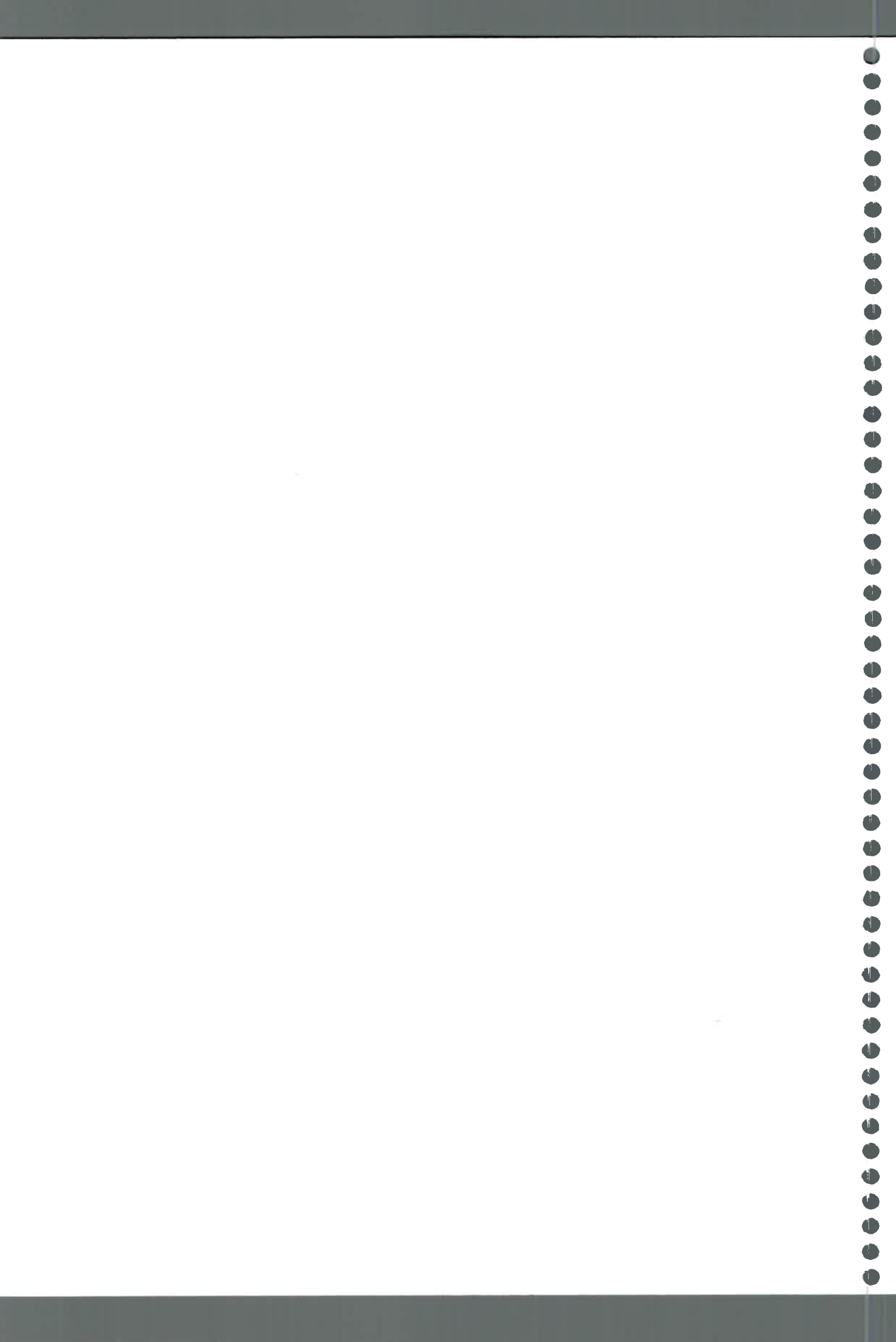
Contenido endógeno de ABA en semillas embebidas y agua de imbibición

De manera similar al análisis de JAs, el contenido de ABA se evaluó en semillas embebidas y agua de imbibición del wt y de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1*. Con la imbibición, las semillas wt mostraron un significativo incremento de ABA desde las 12 hasta las 48 h, alcanzando el máximo contenido (749 pmol.g⁻¹ PS) a las 48 h y disminuyendo posteriormente a las 72 h post-imbibición. La secreción de ABA hacia el medio líquido fue escasa (100 pmol.g⁻¹ PS) y sostenida durante el proceso de imbibición (Fig. 19A).

En las semillas *tss1* el nivel de ABA aumentó significativamente a las 24 h, y alcanzó el máximo contenido (754 pmol.g⁻¹ PS) a las 48 h; a partir de entonces disminuyó abruptamente a las 72 h. De modo similar al wt, en *tss1* la liberación de ABA al agua de imbibición fue baja; aunque a las 48 h se observó un incremento no significativo en sus niveles (Fig. 19B).

El nivel de ABA en las semillas embebidas *tss2* fue inferior al cuantificado en el wt y en *tss1*, y prácticamente no se modificó durante el transcurso de la imbibición. Interesantemente, la secreción de ABA hacia el medio líquido fue mayor que las cantidades cuantificadas en las semillas embebidas (Fig. 19C).

En *tos1* el nivel de ABA fue elevado a las 12 h (186 pmol.g⁻¹ PS), disminuyó levemente a las 24 h y finalmente mostró un incremento no significativo hasta las 72 h. Las semillas embebidas de este mutante secretaron los mayores niveles de ABA hacia el agua de imbibición, comparado con el wt y los restantes mutantes. Así, la liberación de ABA alcanzó un pico de 496 pmol.g⁻¹ PS a las 24 h, el cual fue 200% superior al nivel de ABA cuantificado en las semillas al mismo tiempo. Valores similares fueron registrados a las 48 y 72 h (Fig. 19D).



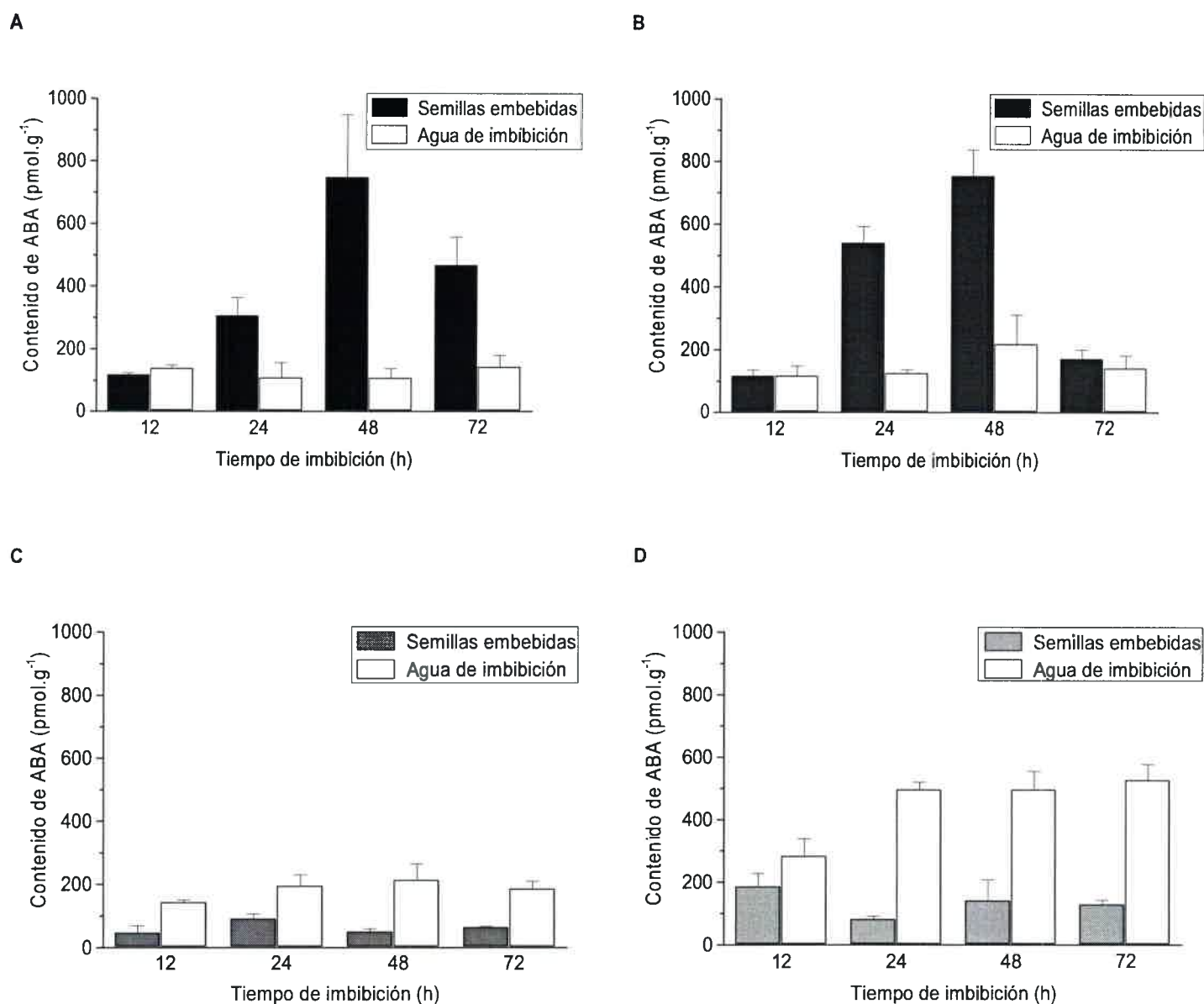


Fig. 19. Contenido endógeno de ABA en semillas embebidas y agua de imbibición. **A.** cv. MoneyMaker; **B.** mutante *tss1*; **C.** mutante *tss2*; **D.** mutante *tos1* ($n=3$, $P < 0.05$).

El ABA secretado al agua de imbibición por las semillas de los mutantes *tss2* y *tos1* fue elevado en relación a los niveles endógenos cuantificados en las semillas a los distintos tiempos. En contraposición, el patrón endógeno y la secreción de ABA por las semillas del mutante *tss1* fue similar al del wt.

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de ABA en el agua de imbibición demuestran que las semillas de los mutantes secretaron mayores cantidades de la hormona en comparación al wt; entre ellos la mayor secreción se observó en el mutante *tos1*.



Contenido endógeno de metabolitos de ABA en semillas embebidas

Previamente ha sido demostrado que los niveles de los metabolitos de ABA son escasos en el medio líquido, dificultando de este modo su identificación (Jacobsen y col. 2002).

En las semillas embebidas, el contenido de metabolitos fue superior al de ABA, y reveló diferentes perfiles entre los germoplasmas analizados.

En el wt, DPA fue el principal metabolito y sus niveles incrementaron desde 2.006 hasta 7.370 pmol.g⁻¹ PS durante el curso de la imbibición. El nivel de PA fue ligeramente alto al inicio del experimento (53 pmol.g⁻¹ PS) y disminuyó considerablemente con el tiempo de imbibición hasta las 72 h, cuando alcanzó valores cercanos a cero. Por su parte, ABA-GE no fue detectado a ningún tiempo de imbibición (Fig. 20A).

Las semillas embebidas del mutante *tss1* presentaron los niveles más bajos de metabolitos entre los cuatro germoplasmas. DPA fue el compuesto más abundante y alcanzó su máxima concentración (1326 pmol.g⁻¹ PS) a las 48 h. PA prácticamente no presentó variaciones en sus niveles durante el transcurso de la imbibición y sólo se detectó un leve aumento, no significativo, a las 72 h. ABA-GE sólo fue detectable al final del proceso de imbibición (48 y 72 h), con una concentración de 615 pmol.g⁻¹ PS (Fig. 20B).

En *tss2*, nuevamente DPA fue el metabolito más importante. A las 12 h post-imbibición presentó el mayor contenido endógeno (8.407 pmol.g⁻¹ PS), disminuyendo luego gradualmente hasta las 72 h. Por el contrario, PA y ABA-GE fueron metabolitos menores (Fig. 20C).

Finalmente, en las semillas *tos1* DPA también correspondió al metabolito más abundante, y sus niveles fueron significativamente elevados a las 12 y 48 h; por el contrario, una abrupta disminución fue registrada a las 24 y 72 h. Esto coincidió con un incremento en los niveles de PA. Este mutante fue el único germoplasma que presentó los mayores niveles de ABA-GE, los cuales fueron considerablemente elevados a las 48 h y máximos (7850 pmol.g⁻¹ PS) a las 72 h posteriores a la imbibición (Fig. 20D).

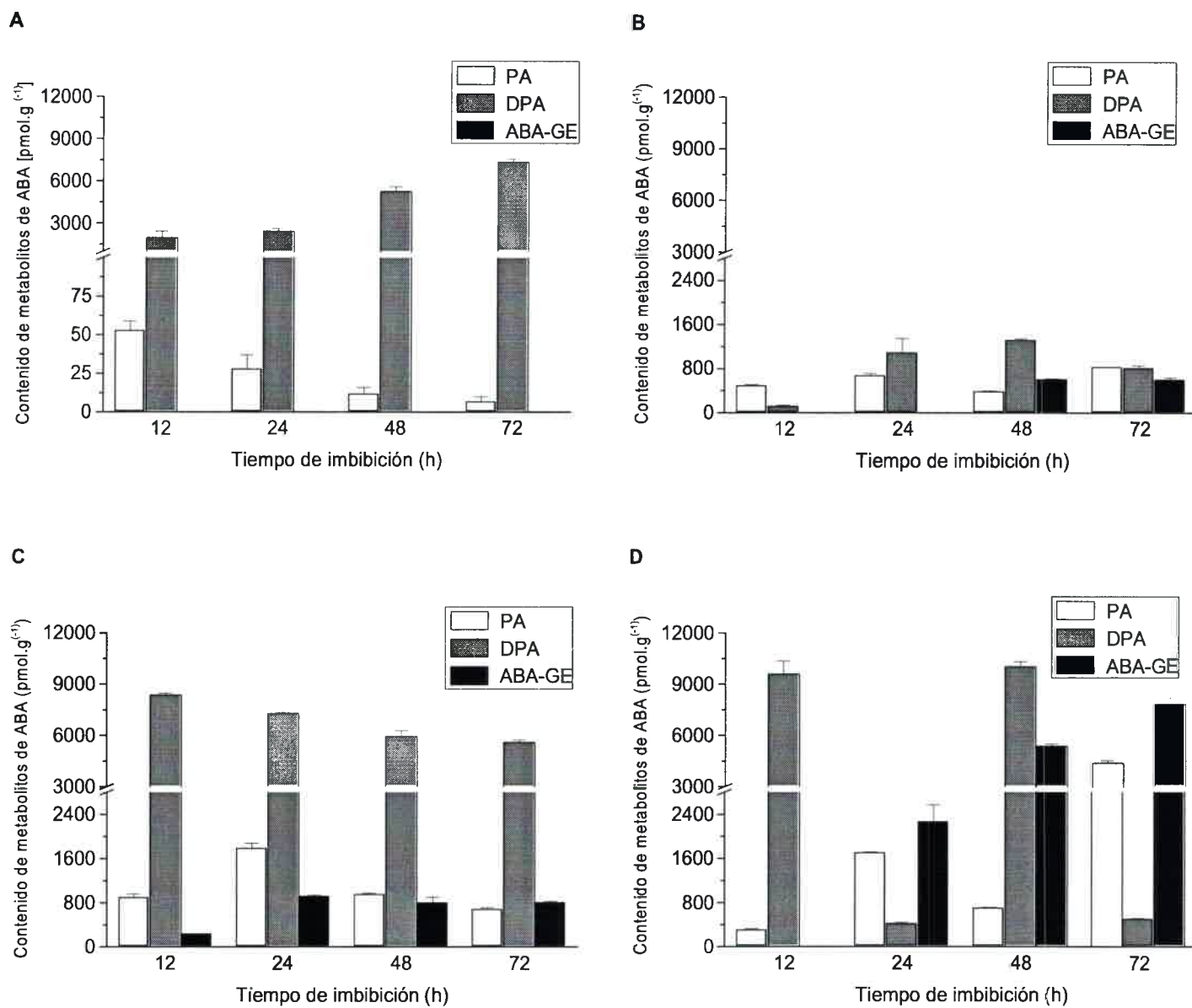


Fig. 20. Contenido endógeno de metabolitos de ABA en semillas embebidas. **A.** cv. MoneyMaker; **B.** mutante *tss1*; **C.** mutante *tss2*; **D.** mutante *tos1* ($n=3$, $P < 0.05$). Debido al bajo contenido de PA, una escala diferente se utilizó en la figura A.





Capacidad germinativa de las semillas wt y de los mutantes

La evaluación de la capacidad germinativa de las semillas wt y de los mutantes se realizó mediante el recuento de germinación y visualización de la protusión radical a diferentes tiempos (Fig. 21).

En todos los germoplasmas analizados el mayor porcentaje de germinación se registró a las 72 h; sin embargo, la emergencia de la radícula fue precoz en las semillas *tss1*, hecho que fue evidente a las 48 h.

Los menores porcentajes de germinación se obtuvieron para el wt y *tos1*, los cuales fueron muy similares entre sí a pesar de que el contenido basal de ABA de las semillas secas wt fue casi el doble de *tos1*. En contraposición, *tss1* y *tss2* mostraron mejor capacidad germinativa, aunque los niveles basales de ABA en las semillas secas fueron muy contrastantes: elevados en *tss1* y mínimos en *tss2*.

Diferencias significativas en el porcentaje de germinación fueron registradas a las 72 h entre el wt y *tss2*, y entre *tss2* y *tos1*.

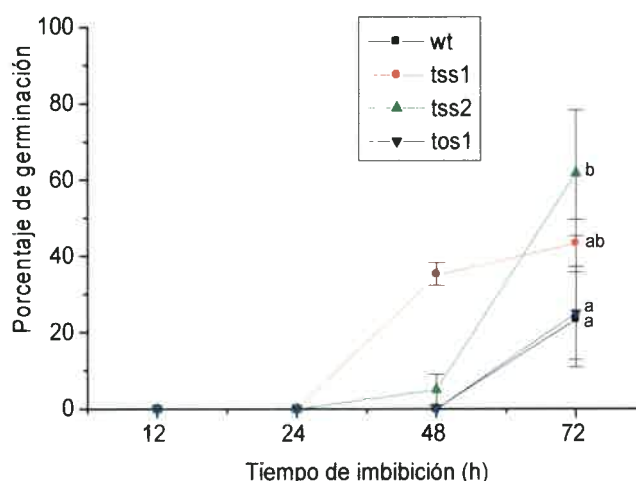


Fig. 21. Porcentaje de germinación de las semillas del cv. Moneymaker y de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* ($n=5 \pm SE$) $p<0.05$. Valores con la misma letra a las 72 h no son estadísticamente significativos.

Las diferencias exomorfológicas, emergencia y longitud de radícula, entre las semillas wt y mutantes a las 48 y 72 h se muestran en la Fig. 22. A las 48 h la radícula fue apenas visible en las semillas wt, *tss1* y *tss2*; mientras que en las



semillas *tos1* no se visualizó la emergencia de la radícula. A las 72 h, se observó que las radículas de las semillas wt y mutantes habían emergido.

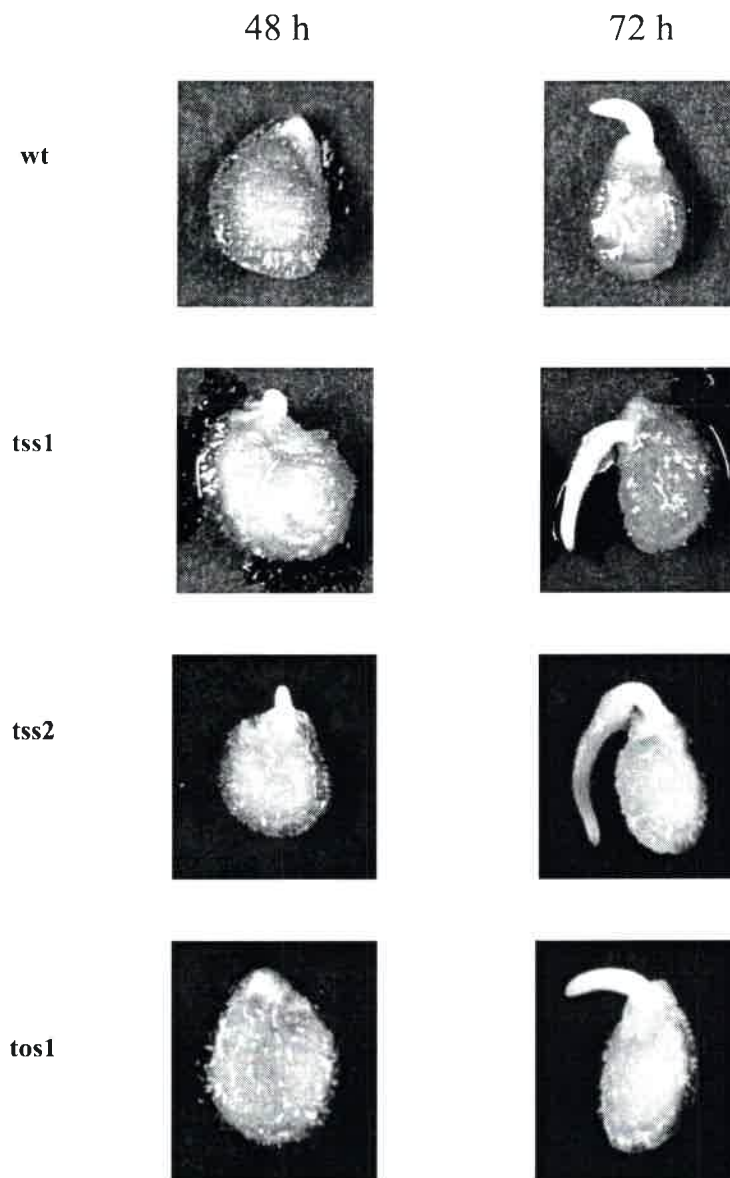


Fig. 22. Exomorfología de las semillas del cv. Moneymaker y de *tss1*, *tss2* y *tos1* a las 48 y 72 h de imbibición.

Debido a la escasa disponibilidad de semillas de los mutantes, y considerando que el wt es un cultivar silvestre cuyo genoma no ha sido modificado, el efecto de JAs y ABA se analizó únicamente en este germoplasma.



Aplicación exógena de jasmonatos y ABA en semillas wt

A fin de evaluar el efecto de JAs y ABA exógenos sobre la capacidad germinativa de las semillas wt se realizaron aplicaciones de JA y de ABA en concentraciones de 10^{-4} y 10^{-6} M. En adición, considerando el alto contenido de las formas hidroxiladas en semillas secas, 11-OH-JA y 12-OH-JA también se probaron exógenamente (Fig. 23).

A las 72 h, ambas concentraciones de JA causaron inhibición de la germinación; mientras que los hidroxilados produjeron un menor efecto inhibitorio. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre semillas controles y tratadas con ambas concentraciones de JA y con respecto a los hidroxilados en la concentración de 10^{-4} M. Asimismo los resultados mostraron que los tratamientos con JAs a concentraciones bajas (10^{-6} M) producen un efecto inhibitorio menor sobre la capacidad germinativa de las semillas wt.

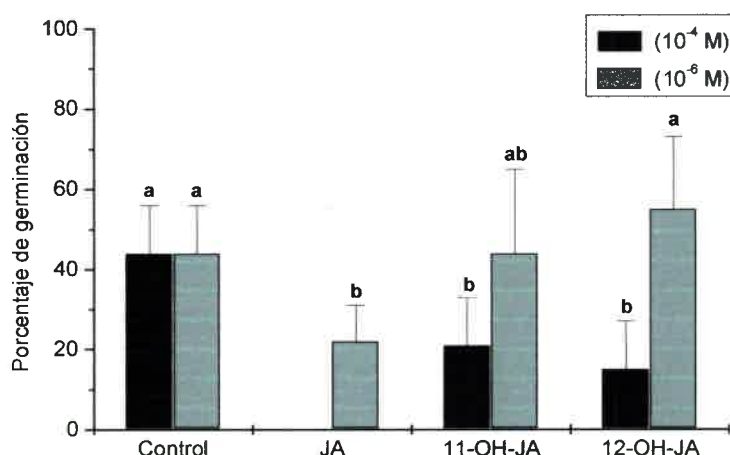
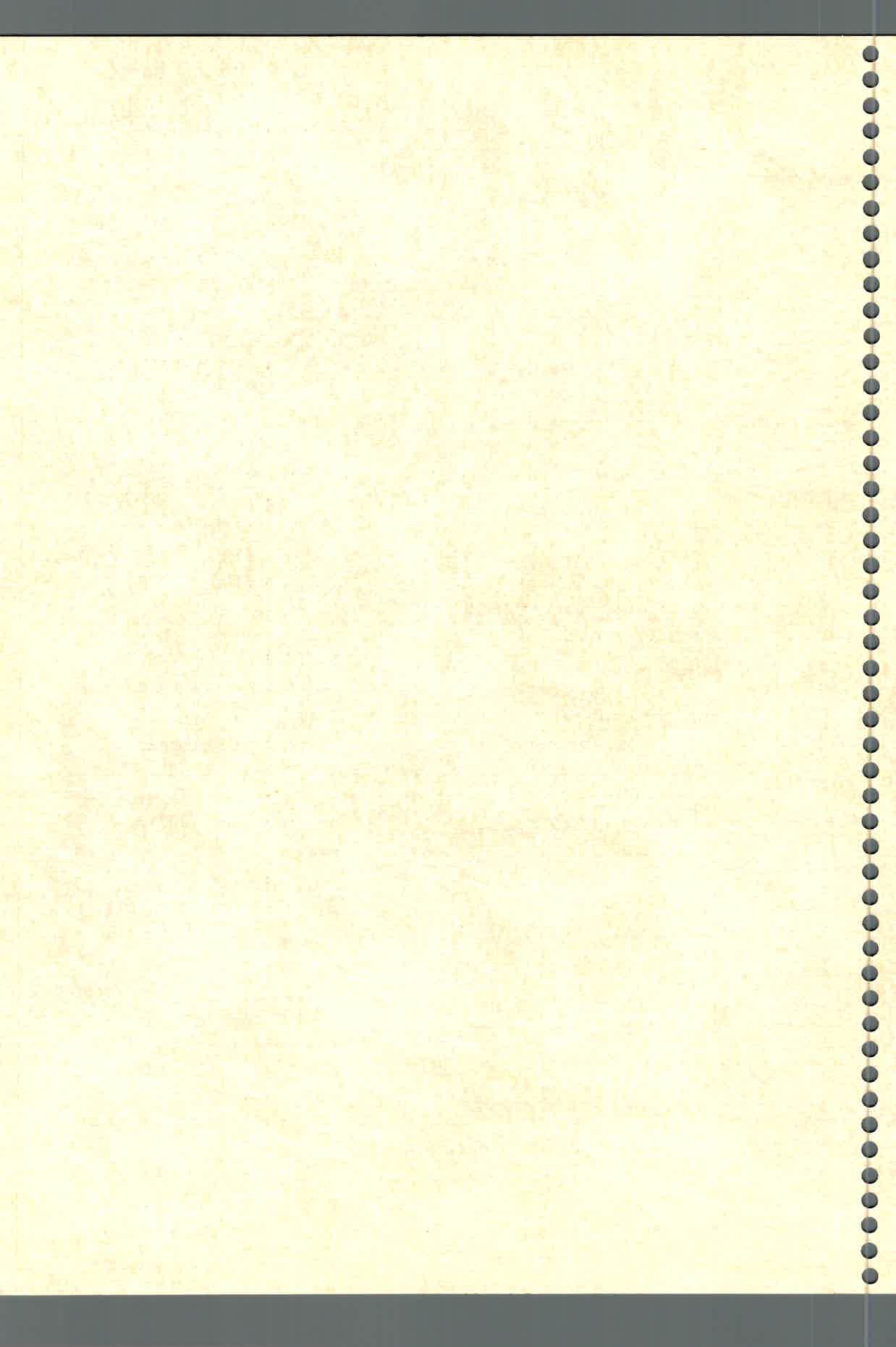


Fig. 23. Efecto de la aplicación exógena de dos concentraciones de JAs y ABA sobre la germinación de semillas del cv. Moneymaker a las 72 h ($n=9 \pm SE$) $p<0.05$. Letras distintas entre control y tratamientos indican diferencias significativas.

Finalmente, la aplicación de ABA exógeno ocasionó una total inhibición de la germinación en ambas concentraciones.



DISCUSIÓN



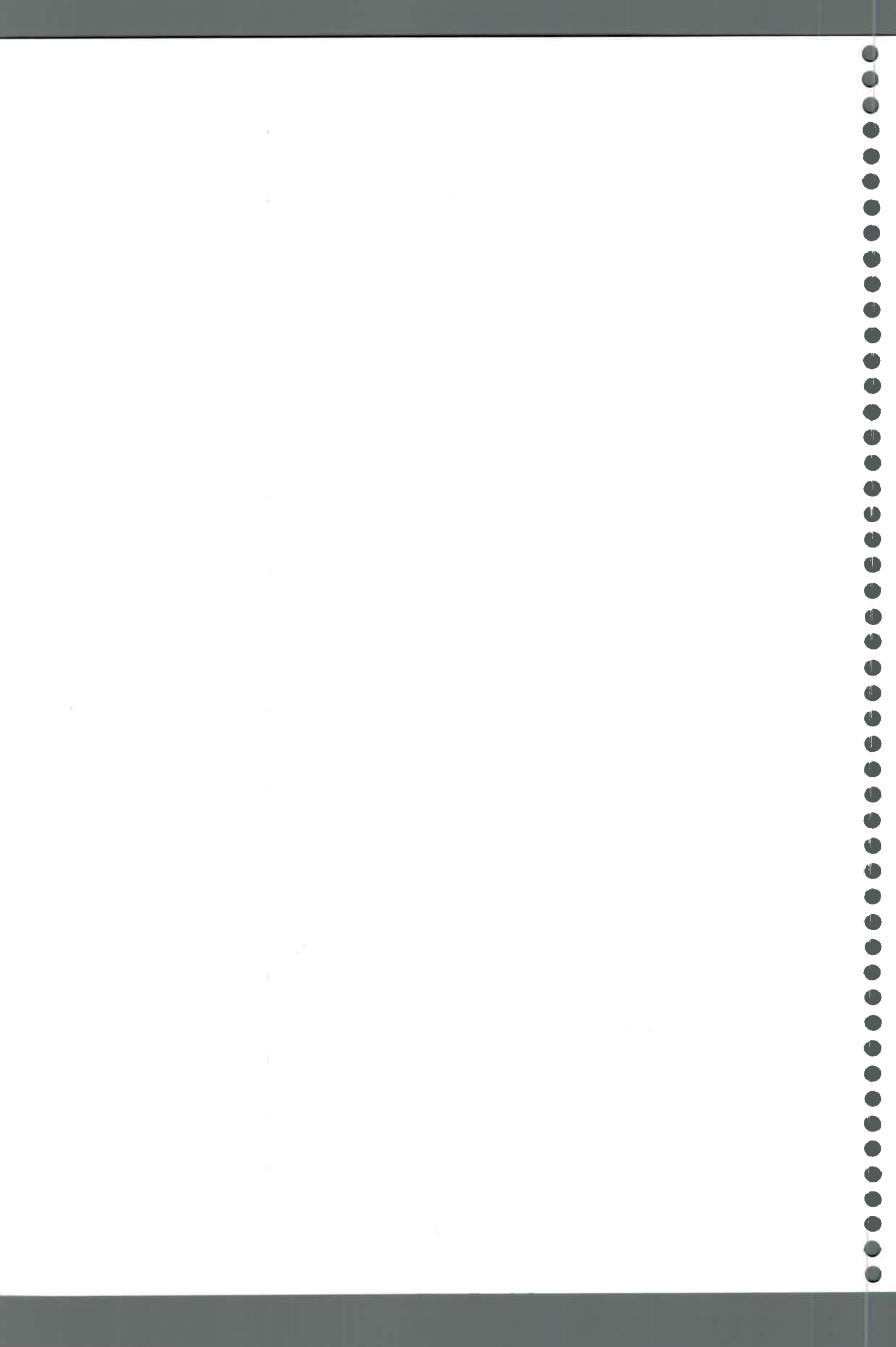
Discusión

El ácido jasmónico, el ácido abscísico y sus compuestos derivados constituyen un importante grupo de moléculas señales implicadas en el control de procesos del desarrollo, como por ejemplo germinación, y en respuestas de defensa a estrés. En relación a JAs, los antecedentes sobre su participación en la germinación y posterior desarrollo de la plántula son escasos. Aplicaciones exógenas de JAs han mostrado resultados contradictorios, con algunos efectos promotores y otros inhibidores de la germinación según las semillas se encuentren o no dormidas.

La acción de estos compuestos exógenos produce numerosos efectos fisiológicos sobre el desarrollo de las plantas (Creelman y Mullet 1997; Wasternack y Hause 2002), algunos de los cuales parecen actuar de manera similar a ABA. En tal sentido, Kramell y col. (2000) proponen que la respuesta a JA exógeno es diferente de la observada por incremento endógeno, indicando que la vía de señalización de un compuesto aplicado exógenamente sería distinta del producido endógenamente.

En este trabajo se informa el importante rol inhibitorio de JA sobre la germinación de semillas de tomate wt a concentraciones fisiológicas medias de 10^{-4} a 10^{-6} M. Los derivados hidroxilados sólo inhibieron la germinación a 10^{-4} M. El efecto de JA fue previamente descrito en *Agrostemma* (Sembdner y Gross 1986), *Avena* (Satler y Thimann 1981) y *Lactuca* (Yamane y col. 1982). Otro regulador reconocido como potente inhibidor de la germinación es ABA, el cual inhibió la capacidad germinativa de las semillas wt, en concordancia con lo propuesto por Carles y col. (2002) y Finkelstein y col. (2002) sobre la función de ABA en este proceso. Dado que ABA exógeno afectó la germinación de semillas de tomate wt, Borsani y col. (2001) clasificaron este germoplasma como “sensible” a ABA. La sensibilidad a ABA del mutante *tss1* fue similar a la del wt.

El mutante *tss2* fue caracterizado como “hipersensible” a ABA exógeno debido a la drástica disminución de su capacidad germinativa luego del tratamiento con este regulador (Borsani y col. 2002). El mínimo umbral de ABA de las semillas *tss2*, caracterizado por su hipersensibilidad a estrés iónico y osmótico, permite establecer una estrecha correlación entre nivel basal de ABA e hipersensibilidad a estrés. Comparado a *tss1* y *tss2*, el mutante *tos1* fue el menos sensible a ABA exógeno ya que no se observó un efecto inhibitorio muy marcado (Borsani y col. 2002).



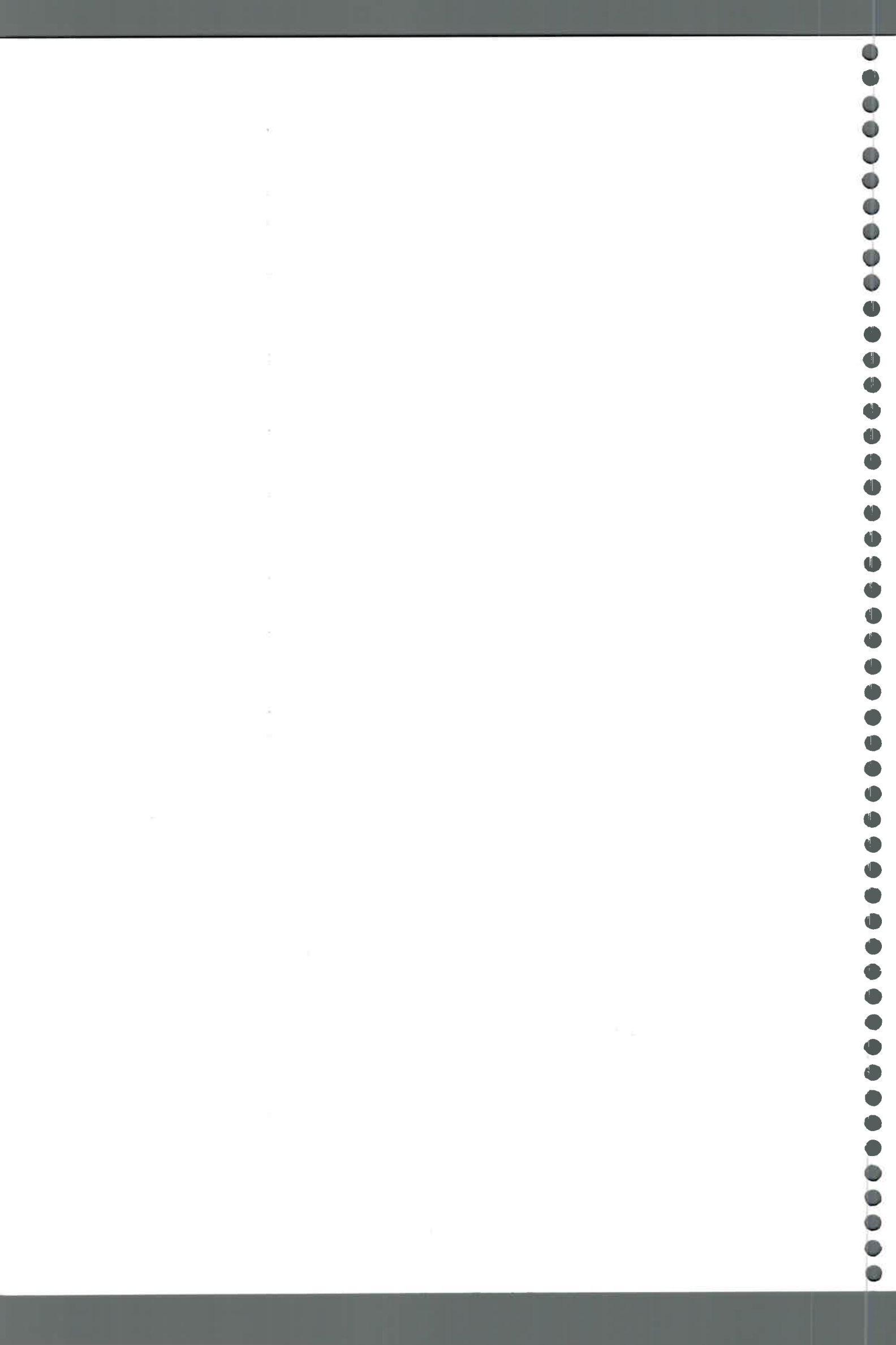
Andrade y col. (2005) identificaron JA, OPDA, ME-JA, 11-OH-JA y 12-OH-JA en semillas secas y embebidas de tomate demostrando que la mayoría de los pasos metabólicos (metilación, hidroxilación) ocurren durante la formación de la semilla y con el inicio de la imbibición. Algunas de esas reacciones podría conducir a la inactivación irreversible de JA, mientras que otras podrían ser reversibles y utilizadas como formas de almacenamiento y/o transporte.

En semillas secas, JA fue el compuesto menos abundante en el cv. Moneymaker (wt); por el contrario, en semillas secas de soja se detectaron elevados niveles endógenos de JA (Creelman y Mullet 1995). Las formas hidroxiladas fueron las mayoritarias en el wt y en los mutantes, y entre los hidroxilados la más abundante fue 12-OH-JA. Las semillas de los mutantes hipersensibles a estrés iónico y osmótico, *tss1*, *tss2* y *tos1*, presentaron un menor contenido basal de los hidroxilados de JA que las wt, lo que sugiere una correlación estrecha entre hipersensibilidad a estrés de los mutantes y bajo umbral de estos compuestos.

El contenido más bajo de JAs en semillas secas fue registrado para *tss1*, caracterizado por Borsani y col. (2001) como hipersensible a estrés iónico. Mientras que el contenido de JAs de *tss2*, hipersensible a estrés iónico y osmótico, fue similar al de *tos1*, hipersensible a estrés osmótico. Además, un umbral más elevado de JA se observó en *tss2* y *tos1* respecto al wt. Estos dos mutantes se diferenciaron de *tss1* por su mayor contenido de JA, lo cual establece otra nueva similitud entre *tss2* y *tos1*, indicando diferencias constitutivas entre el wt y los mutantes sensibles a estrés osmótico. Por lo tanto, los diferentes niveles endógenos de JA adquieren importancia a partir de que este compuesto induciría enzimas de su vía de síntesis (Strassner y col. 2002).

La acumulación preferencial de 12-OH-JA en semillas wt indica que el mecanismo hidroxilativo es funcional durante la formación de la semilla, y que este compuesto podría cumplir un rol específico, probablemente inhibitorio, durante el proceso de germinación. En los mutantes también predominó la acumulación de este compuesto aunque su contenido fue menor que en las semillas wt (Andrade y col. 2005).

En coincidencia con los resultados de Andrade y col. (2005), Miersch y col. (2007, comunicación personal) detectaron en semillas secas de tomate el derivado 12-OH-JA como compuesto mayoritario, y entre los minoritarios a 11-OH-JA, JA-Ile, JA-Ile-ME, OPDA, ME-JA y JA. Además, 12-OH-JA fue el más abundante en el pericarpo y gelatina del fruto de tomate (Miersch y col.



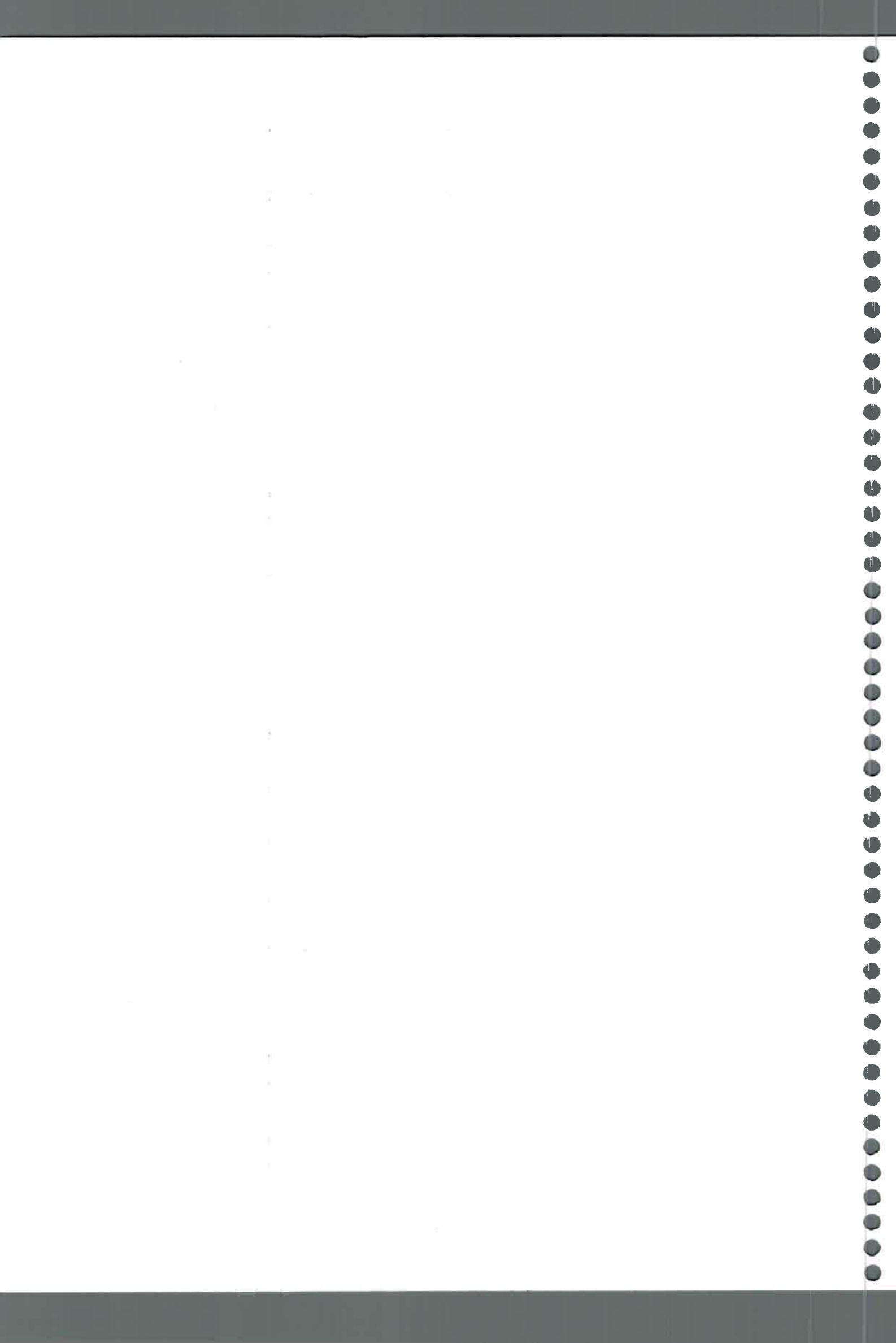
2007, comunicación personal). En semillas inmaduras de soja los niveles de 12-OH-JA exceden los de JA por encima de 275 veces (Miersch y col., resultados no publicados).

Inicialmente JA hidroxilado y su *O*-glucósido fueron encontrados exclusivamente en especies de Solanáceas (Yoshihara y col. 1989). Recientemente, Cenzano y col. (2005) detectaron los derivados hidroxilados en estolones y tubérculos jóvenes de papa. Su presencia también se informó en flores de tomate (Miersch y col. 1998), en *Solanum demissum* (Helder y col. 1993), *Arabidopsis thaliana* (Gidda y col. 2003) y en el hongo *Botryodiplodia theobromae* (Miersch y col. 1991). Por lo tanto, la distribución de 12-OH-JA no está restringida sólo a especies que producen tubérculos como se creyó años atrás, sino que se discute su función en otros procesos fisiológicos de las plantas.

12-OH-JA y su derivado sulfatado fueron encontrados en *Arabidopsis* (Gidda y col. 2003), y el análisis de numerosas Mono y Dicotiledóneas reveló la acumulación de 12-OH-JA en varias especies. El tiempo de floración en *Arabidopsis* está íntimamente ligado a la conversión de 12-OH-JA a su derivado sulfonado inactivo (Gidda y col., resultados no publicados).

A diferencia de JA, 12-OH-JA no inhibe el crecimiento ni muestra un rol en el enrollamiento de los zarcillos (Koda, 1992; Blechert y col. 1999), tampoco induce genes que responden a JA, tales como THIONIN2 en *Arabidopsis* (Gidda y col. 2003), PIN2 en tomate (Stenzel y col. 2003) o un grupo de genes inducidos por JA en cebada (Miersch y col. 1999). Estos datos sugieren que la hidroxilación podría ser una vía de inactivación de la señalización de JA, al menos para algunos subgrupos de genes. En *Arabidopsis*, fue clonada una sulfotransferasa que convierte específicamente 12-OH-JA a la forma sulfonada (Gidda y col. 2003). La hidroxilación ó sulfonación de compuestos es un mecanismo bien conocido en animales para desactivar hormonas, sugiriendo a la hidroxilación de JA seguida de sulfonación como una ruta de total inactivación de la señalización de JA.

Por otra parte, el mayor contenido basal de 12-OH-JA respecto a 11-OH-JA en semillas secas supone una vía de conversión de 11-OH-JA a 12-OH-JA o una hidroxilación preferencial en el C12 respecto al C11. Sin embargo, este patrón de hidroxilación no se cumple en plántulas de cebada ya que [¹⁴C]-± -JA causó una mayor hidroxilación en el C11 que en el C12 (Sembdner y col. 1990). De este modo, dado que aún no se conoce la/s enzima/s que actúa en



estos pasos metabólicos, la elucidación del rol de los derivados hidroxilados es todavía incierta.

La incorporación de agua a las semillas wt y *tss1* modificó la proporción de los hidroxilados. En el curso de la imbibición, los JAs fueron secretados por las semillas a la fase líquida, aunque en proporciones diferentes.

El contenido de JA y OPDA fue bajo en semillas y su liberación al agua de imbibición, escasa; mientras que las formas hidroxiladas fueron las mayoritarias y su secreción, abundante. La importante liberación de los hidroxilados estaría determinada por la abundancia de estos compuestos en las semillas y/o por su mayor solubilidad en agua.

El incremento de 12-OH-JA con la imbibición demostró que las semillas tienen capacidad de sintetizar este derivado. Sin embargo, el cultivar wt mantuvo un nivel constante de 11-OH-JA mientras que *tss1* aumentó el contenido de este compuesto. Estos resultados sugieren que la imbibición desencadena la síntesis de los hidroxilados ya que el contenido de estos compuestos fue superior al de semillas secas (Andrade y col. 2005).

Por otro lado, el contenido de ABA en semillas secas fue muy superior al de JAs. Las semillas secas del wt y de los mutantes presentaron diferentes niveles basales de ABA y metabolitos, lo cual se correlacionaría con su capacidad germinativa diferencial. Excepto en el mutante *tss2*, el contenido de ABA en semillas secas fue superior al de semillas embebidas. Por ejemplo, el contenido de ABA en las semillas wt y *tss1* fueron ~67 y 50 veces mayores, respectivamente, que los determinados a las 48 h de imbibición, lo que sugiere que ABA es sintetizado y se acumula durante la formación de la semilla para prevenir la germinación precoz (Andrade y col. 2007, enviado). Sin embargo, numerosos estudios no demostraron una relación consistente entre contenido de ABA en semillas secas maduras y capacidad germinativa (Jacobsen y col. 2002).

Durante la imbibición todos los germoplasmas disminuyeron abruptamente los niveles de ABA. Así, en las semillas secas del wt el nivel de ABA fue 49.873 pmol.g⁻¹ PS versus 750 pmol.g⁻¹ PS a las 48 h de imbibición; valores similares se obtuvieron para el mutante *tss1*, 38.136 pmol.g⁻¹ PS versus 754 pmol.g⁻¹ PS. Los metabolitos de ABA incrementaron durante el transcurso de la imbibición y mostraron diferencias cuali y cuantitativas entre todos los germoplasmas estudiados (Andrade y col. 2007, enviado).

El bajo porcentaje de germinación del wt sería consecuencia no sólo del mayor contenido de ABA en las semillas secas sino también del ABA



sintetizado *de novo* durante la imbibición, dado que los niveles hormonales aumentaron considerablemente hasta las 48 h. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Grappin y col. (2000), quienes demostraron que en semillas dormidas de *Nicotiana plumbaginifolia* parte de su contenido de ABA resulta de la síntesis *de novo* durante la imbibición temprana.

Las semillas secas y embebidas del mutante *tss1* presentaron un contenido de ABA similar al del wt. El contenido endógeno y el metabolismo de ABA podrían tener menos influencia sobre la capacidad germinativa de este mutante, considerando su germinación precoz relativa a la de los otros germoplasmas. Valpuesta y Botella (2007) sugirieron que el locus *TSS1* podría codificar un sensor de Ca^{+2} . Recientemente se informó que un miembro de la familia génica *Arabidopsis calmodulin-like* (CML), el gen CML24, podría actuar corriente abajo de la percepción de ABA mediando quizás las respuestas celulares a las fluctuaciones de Ca^{+2} , inducidas por ABA para retrasar la germinación y el crecimiento de la plántula (Delk y col. 2005). En este estudio, *tss1* mostró altos niveles endógenos de ABA durante la imbibición, aunque germinó precozmente con respecto al wt. La baja sensibilidad de este mutante a ABA endógeno podría deberse a que la mutación afecta un sensor de Ca^{+2} similar a CML24, bloqueando por lo tanto la señalización intracelular.

Los mayores porcentajes de germinación correspondieron a *tss2* y se correlacionaron con el bajo contenido de ABA en las semillas secas así como después de las 72 h de imbibición. El locus *TSS2* es requerido tanto para tolerancia iónica como osmótica y se propuso que codificaría una proteína que regula negativamente la señal de ABA (Borsani y col. 2001). Los resultados sugieren que este mutante posee un activo catabolismo aunque una reducida biosíntesis de ABA, precisamente regulada. Un patrón similar de biosíntesis fue observado en las semillas embebidas *tos1*, evidencia que soporta lo propuesto por Borsani y col. (2002) acerca de que *tos1* no es un mutante deficiente en ABA.

Wang y col. (1995) reportaron que el efecto inhibitorio de ABA sobre la germinación de embriones aislados de semillas de cebada se debió a la difusión de la hormona fuera de los embriones y su acumulación en el medio de incubación. En adición, Jacobsen y col. (2002) observaron que el contenido de ABA en embriones de semillas secas de cebada decayó considerablemente entre las 6 y 12 h de iniciada la hidratación, mientras que el contenido de PA aumentó. Sin embargo, luego de las 12 h PA disminuyó, sugiriendo que podría haber sido convertido a DPA. Estos autores señalan que la pérdida de ABA es



causada por su conversión a metabolitos biológicamente inactivos, y proponen que su transformación a PA constituye una vía de inactivación.

Andrade y col. (2007, enviado) demostraron que ABA difundió fácilmente desde las semillas embebidas *tos1* hacia el medio líquido, ya que sus niveles fueron dos veces superiores a los cuantificados en el agua de imbibición de *tss1* o *tss2*. El mutante *tos1* (caracterizado como hipersensible a estrés osmótico) podría tener un daño en la membrana celular que provoca una importante pérdida de ABA fuera de la semilla. Sin embargo, este hecho no tendría efecto sobre la capacidad germinativa, dado que el porcentaje de germinación de *tos1* fue similar al del wt e inferior a los de *tss1* o *tss2*. De este modo, la menor capacidad germinativa de las semillas *tos1* conjuntamente con niveles medios de ABA, sugiere que la hipersensibilidad osmótica de este mutante no se debe a un nivel reducido de ABA, sino más bien a una inadecuada vía de señalización de la hormona necesaria para tolerancia a estrés osmótico (Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki 1996). En este sentido, Borsani y col. (2002) proponen que la hipersensibilidad osmótica de este mutante es causada por un defecto a nivel intracelular de la vía de señalización dependiente de ABA necesaria para tolerancia osmótica. Considerando los altos niveles de ABA secretados por las semillas *tos1*, es posible inferir que la percepción extracelular o la señalización de ABA podrían estar alterados en este mutante.

Millar y col. (2006) sugieren que los distintos procesos fisiológicos mediados por ABA a menudo se correlacionan con fluctuaciones en los niveles endógenos de la hormona, los cuales son regulados a través de un preciso balance entre biosíntesis y catabolismo. Así, en las células vegetales los niveles de ABA son dinámicamente mantenidos a través de procesos continuos de síntesis, transporte y degradación.

La abrupta disminución de ABA luego del comienzo de la imbibición sería consecuencia de la activación de la vía catabólica, en coincidencia con resultados reportados previamente (Yoshioka y col. 1998; Grappin y col. 2000; Jacobsen y col. 2002; Kushiro y col. 2004). En tal sentido, existen diversas vías catabólicas alternativas para la inactivación de ABA (Zhou y col. 2004; Nambara y Marion-Poll 2005). No obstante, la hidroxilación de ABA en la posición 8' para producir 8'-hidroxi-ABA, el cual es convertido a PA, es considerada la vía catabólica predominante (Nambara y Marion-Poll 2005). En cebada y *Arabidopsis*, la disminución de ABA durante la imbibición de las semillas se asoció a un incremento en el contenido de PA (Jacobsen y col. 2002; Kushiro y col. 2004) o sus derivados, los cuales son considerados los





principales catabolitos reportados en la mayoría de los procesos fisiológicos relacionados a ABA. Kushiro y col. (2004) informaron que el rápido catabolismo de ABA durante la imbibición de semillas de *Arabidopsis* se debió a un incremento en los niveles de mRNA-*CYP707A2*, un miembro de la familia génica *CYP707A* que codifica para la ABA 8'-hidroxilasa. La expresión del gen *AtCYP707A2* se asoció con la declinación en los niveles de ABA en semillas germinantes. En contraposición, la declinación en el nivel de ABA en semillas embebidas de los mutantes *etr1-2* de *Arabidopsis thaliana* no fue acompañada por incremento en ninguno de los catabolitos monitoreados (Chiwocha y col. 2005).

En este estudio se detectó la presencia de PA y DPA en semillas secas y embebidas del wt y mutantes, confirmando de este modo la 8'-hidroxilación como la principal ruta catabólica de ABA.

En las semillas embebidas wt, la concentración total de PA fue rápidamente metabolizada a DPA, cuyos niveles aumentaron durante la imbibición.

En el mutante *tss2*, en comparación a *tss1*, se registraron los niveles más bajos de ABA y por el contrario, los más altos de DPA; esto evidencia una correlación entre sensibilidad a estrés osmótico y niveles de ABA / DPA, y una vía de regulación del metabolismo de ABA en *tss2* y *tos1* diferente de aquella observada en *tss1*.

En *tss1*, mutante hipersensible a estrés iónico y no a estrés osmótico en general, la vía de 8'-hidroxilación fue prácticamente inactiva y en consecuencia los niveles de PA y DPA fueron los más bajos entre los germoplasmas estudiados. También la germinación precoz de este mutante fue coincidente con su bajo contenido de DPA, hecho que concuerda con Chiwocha y col. (2003), quienes informaron que la 8'-hidroxilación y la formación de DPA son procesos inhibidos o representan una vía catabólica menor en condiciones que promueven la germinación.

El análisis de los perfiles de expresión de los genes *NCED* y *CYP707A* en plantas transgénicas y mutantes, sugieren que la actividad de la 8'-OH-ABA constituye una diferencia clave entre el estado dormido y no-dormido de semillas de *Arabidopsis* y cebada; por lo tanto, el nivel de dormición podría ser modificado a través de la manipulación de estos genes (Millar y col. 2006).

En semillas de manzana y en frutos y semillas de cereza, DPA fue el principal metabolito y alcanzó niveles superiores a los de ABA, sugiriendo su actuación en la regulación de los niveles endógenos de la hormona en semillas (Setha y col. 2005). Nuestra observación de que PA fue un compuesto



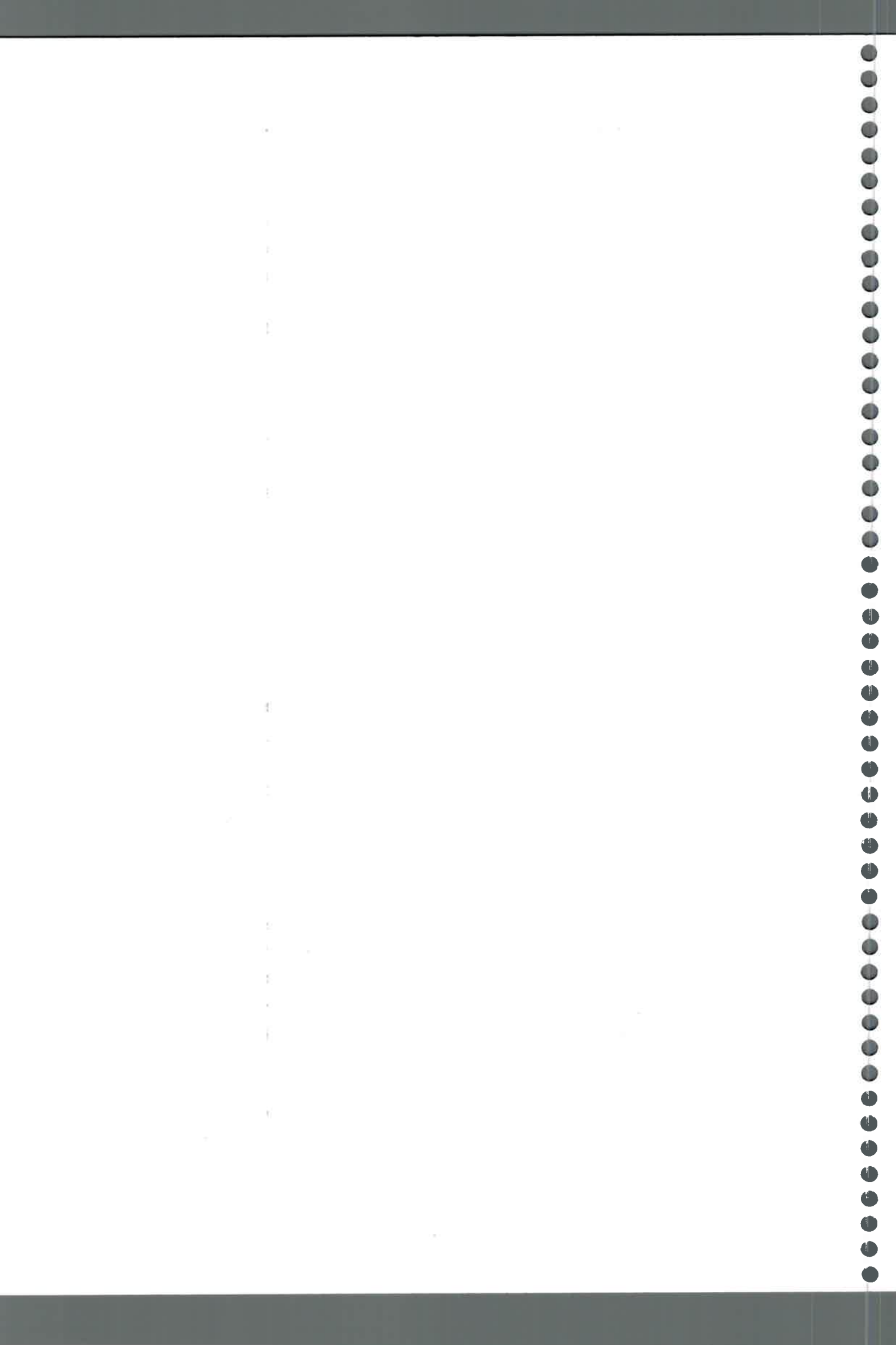
minoritario en las semillas embebidas podría explicarse a través de su rápida reducción a DPA. Similarmente, Zhou y col. (2003) detectaron que en semillas germinantes de *Brassica napus* la principal vía catabólica de ABA fue la 8'-hidroxilación para producir DPA.

De acuerdo a los resultados obtenidos, sólo las semillas *tos1* mostraron los cambios más relevantes en el metabolismo de ABA (por ej., en las cantidades relativas de PA y DPA) como consecuencia de la imbibición. La disminución en los niveles de DPA a las 24 y 72 h podría ser resultado de su posterior metabolismo al derivado 4'-glucósido, compuesto no cuantificado en este trabajo. No obstante, la reacción de glucosilación de DPA ha sido previamente reportada en varias especies vegetales (Walton y Li 1995).

El wt fue el único germoplasma donde no se detectó catabolismo de ABA mediante glucosilación; esta vía catabólica constituyó una ruta menor en las semillas de tomate. Este hecho es consistente con lo observado por Wang y col. (2002) quienes señalan que la conjugación a ABA-GE no representó la principal vía de catabolismo de ABA en granos de maíz. Por el contrario, en semillas germinantes de lechuga la glucosilación fue la vía catabólica predominante (Chiwocha y col. 2003). Asimismo, el alto contenido de ABA-GE en semillas de *Arabidopsis* wt bajo condiciones de germinación sugiere que el metabolismo de ABA a ABA-GE contribuiría a la disminución de ABA durante esta etapa (Chiwocha y col. 2005).

ABA-GE exhibe escasa o ninguna actividad biológica. Sin embargo, se ha caracterizado una β -D-glucosidasa apoplástica que provoca la liberación de ABA de ABA-GE, y la actividad de esta enzima aumentó siete veces en plantas sometidas a estrés salino (Dietz y col. 2000). En adición, Sauter y col. (2002) proponen que los derivados conjugados podrían funcionar como efectivas señales hormonales en situaciones de estrés, intensificando la señal de ABA a larga distancia. A pesar de esto, ABA-GE puede actuar como molécula señal sólo cuando ABA es liberado del compuesto conjugado fisiológicamente inactivo. Los fluidos intercelulares contienen una amplia variedad de glucosidasas, y en plantas se ha detectado una importante familia de β -glucósido-hidrolasas. Los derivados ABA glucosil-ésteres son escindidos por enzimas hidrolasas con alta selectividad hacia la forma conjugada de la hormona, o bien por acción de β -glucosidasas con baja especificidad de sustrato.

En las semillas *tos1*, el incremento en la concentración de ABA-GE desde las 24 hasta las 72 h post-imbibición indica que la vía de glucosilación es activa



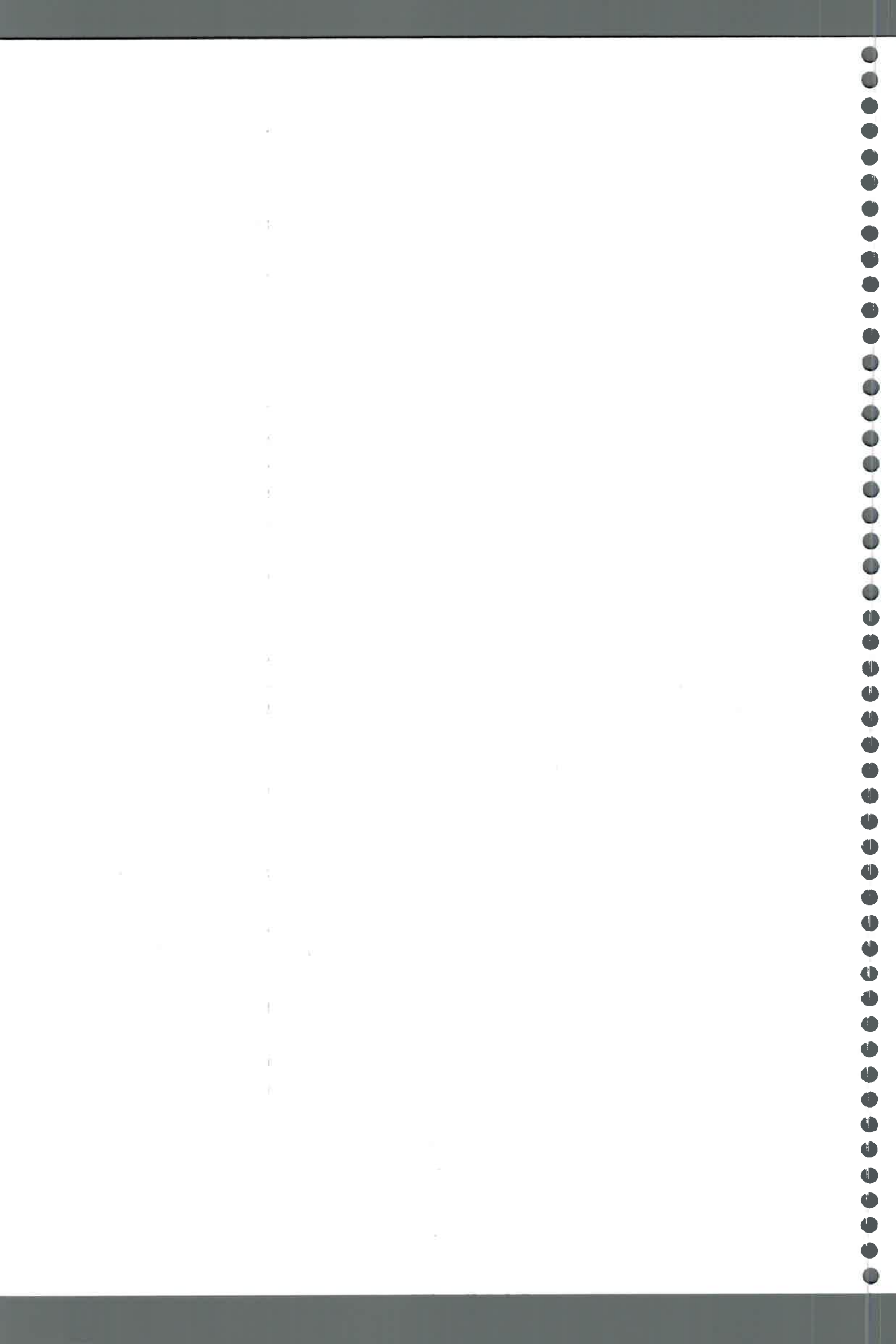
en este mutante y que, conjuntamente con la 8'-hidroxilación, son responsables de los bajos niveles de ABA libre de estas semillas. Interesantemente, este mutante mostró una capacidad germinativa similar a la del wt, aunque el contenido y el metabolismo de ABA fueron completamente diferentes en ambos germoplasmas. Es posible que en las semillas *tos1* la vía de glucosilación represente una inactivación reversible de ABA sólo necesaria para la sensibilidad a estrés osmótico de este mutante cuando actúa una ruta que produce DPA independiente de la 8'-hidroxilación (Andrade y col. 2007, enviado).

En base a lo expresado anteriormente, se puede afirmar que la importancia relativa de las distintas vías catabólicas de ABA varía entre las diferentes especies vegetales e incluso entre los tejidos de la misma especie (Schwartz y Zeevaart 2004).

Nuestros resultados demuestran que el metabolismo de ABA es regulado diferencialmente en semillas secas y embebidas wt y mutantes. A pesar de que existen dos rutas metabólicas principales, la oxidación de PA a DPA, y la conjugación de ABA a su glucosil-éster (ABA-GE), el catabolismo de PA a DPA es en todos los casos la vía predominante. De esta forma, DPA es el principal metabolito que actúa en la regulación de los niveles endógenos de ABA durante la germinación. No obstante, la oxidación a DPA parece ser una vía de menor importancia en *tss1*, mutante hipersensible a estrés iónico.

El análisis cuali y cuantitativo del metabolismo de ABA en la germinación de los mutantes de tomate hipersensibles contribuye al conocimiento que existe sobre el papel regulador de ABA en este proceso. Aún así, el esquema catabólico de ABA está lejos de ser completamente dilucidado, y en tal sentido, son necesarios extensos estudios sobre el rol de los metabolitos en los procesos biológicos que ocurren en plantas.

Por otra parte, y considerando los resultados obtenidos en el estadio de plántula, la presencia y abundancia relativa de JAs permite confirmar la existencia de diferentes perfiles de los miembros de esta familia de compuestos; según lo propuesto por Weber y col. (1997) diferentes especies, órganos y tejidos exhiben un “sello oxilipina” característico que puede modificarse durante las etapas ontogénicas. De esta manera, el contenido de los hidroxilados en semillas secas wt y mutantes decae a niveles apenas detectables en plántulas; lo que pone de manifiesto que la ontogenia produce modificaciones en las proporciones de los diferentes JAs, confirmando la existencia del “sello oxilipina”. En concordancia, Hause y col. (2000)



informaron que durante la etapa del desarrollo floral de plantas de tomate los diferentes tejidos presentan distintas cantidades de JAs, con altos niveles de OPDA, JA y derivados conjugados con aminoácidos.

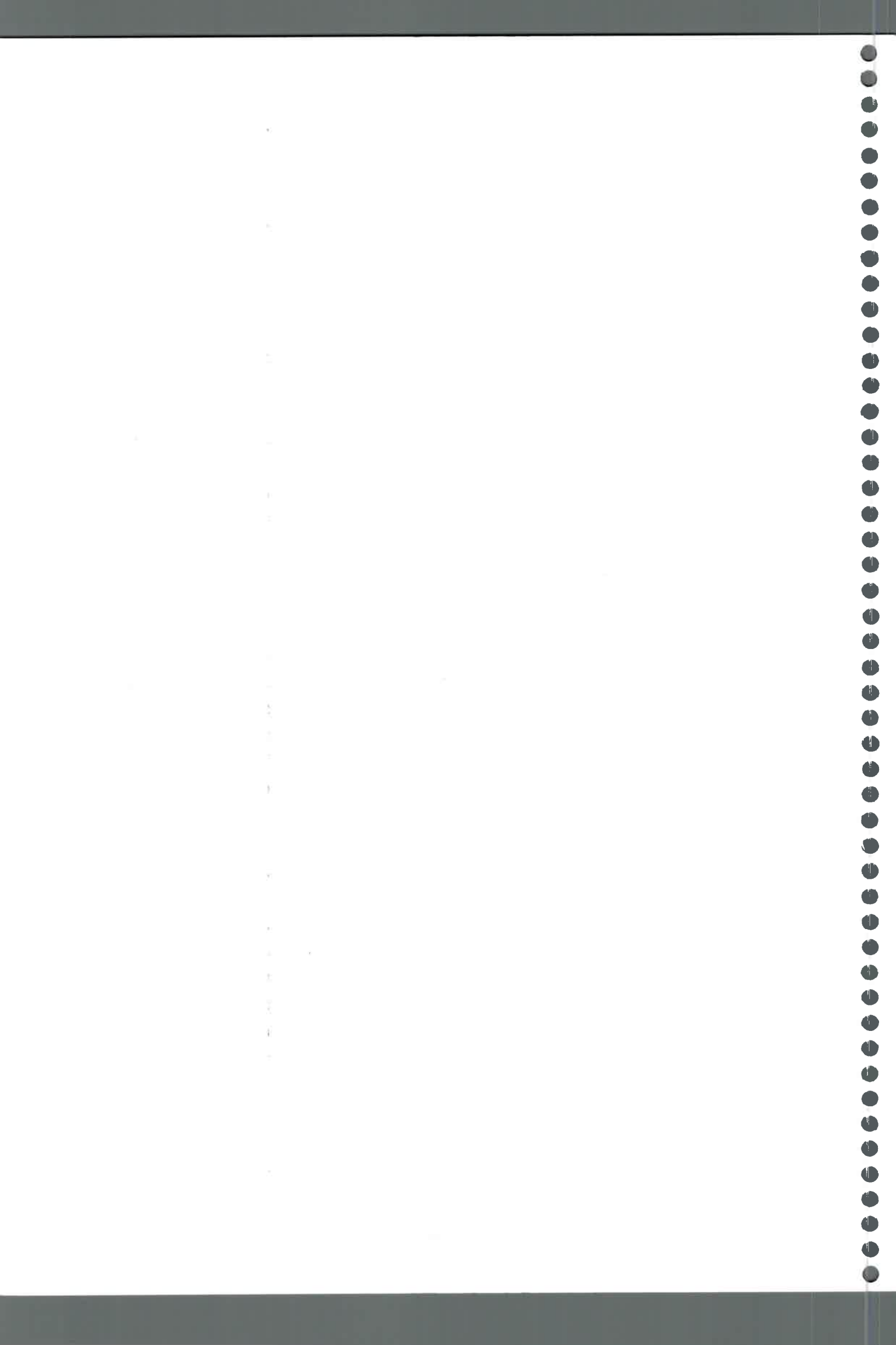
A diferencia de lo que ocurre con los hidroxilados, las plántulas del wt y de los mutantes, en comparación a las semillas secas, mostraron mayor contenido del precursor OPDA, registrándose el nivel más elevado en *tos1*. Sin embargo, el alto contenido de OPDA no se vió reflejado en un aumento de la síntesis de JA ni de ME-JA.

En plántulas control los niveles de OPDA y de 12-OH-JA permitieron diferenciar el wt de sus mutantes. El mutante *tos1* sensible a estrés osmótico presenta un patrón de JAs que difiere del wt y de los restantes mutantes.

También se han observado diferentes patrones de JAs en respuesta a estrés abiótico generado por NaCl o por manitol/sorbitol (Lehmann y col. 1995; Kramell y col. 2000). En general, una característica común de la mayoría de las plantas utilizadas como modelos experimentales es su capacidad para responder a situaciones de estrés biótico y abiótico a través de un incremento en los niveles endógenos de JA (Wasternack y Hause 2002). En tomate, cultivares con diferente grado de tolerancia a estrés y capacidad para acumular sodio, también presentaron diferencias en su contenido basal de JAs. En el cv. Pera (tolerante) el nivel de JA fue superior que en el cv. Hellfrucht Früshtamm (sensible), y durante el desarrollo vegetativo se detectaron variaciones en el contenido de JA y ME-JA en ambos cultivares en respuesta a estrés salino. Asimismo, cuando raíces del cv. Pera transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* se trataron con NaCl los niveles de OPDA, y en menor grado de JA, incrementaron en respuesta a este efector (Abdala y col. 2003).

De acuerdo a los resultados obtenidos, ME-JA no parece desempeñar un papel determinante en la respuesta de las plántulas a estrés salino, ya que sus niveles permanecieron bajos. En raíces del cv. Hellfrucht Früshtamm el contenido de ME-JA también fue escaso aunque se incrementó levemente luego del tratamiento con NaCl (Pedranzani y col. 2003). Estas evidencias concuerdan con lo observado por Moons y col. (1997), quienes encontraron un incremento gradual de ME-JA en raíces de arroz 12 h después del estrés salino.

En este trabajo las plántulas de tomate wt y mutantes respondieron diferencialmente al estrés por NaCl y manitol. Una acumulación significativa de 12-OH-JA posterior al tratamiento salino fue registrada en el wt aunque no en los mutantes, lo cual indicaría que este compuesto estaría involucrado en los mecanismos que confieren tolerancia a estrés. Además, el incremento de 12-



OH-JA podría sugerir que el estrés salino estimula enzimas involucradas en la hidroxilación del C12, tal como fue demostrado para otras enzimas de la biosíntesis de JA, como LOX y AOS (Pedranzani y col. 2003). En presencia de manitol sólo OPDA incrementó, hecho que concuerda con lo informado por Kramell y col. (2000) en hojas de cebada estresadas con sorbitol.

Comparando la respuesta a NaCl de las plántulas de los tres mutantes, sólo *tos1* modificó dramáticamente los niveles de JAs por efecto del tratamiento salino. La significativa disminución en el contenido de estos compuestos podría considerarse como un factor determinante de la hipersensibilidad de este mutante. Borsani y col. (2002) demostraron que *tos1* no es sensible a dosis menores de 100 mM de NaCl, esta característica sumada a la hipersensibilidad a estrés osmótico, ponen de manifiesto que NaCl provoca un efecto principalmente iónico, y que sólo a altas concentraciones genera un grado suficiente de estrés osmótico que limita el crecimiento radical. Sin embargo, a pesar de haber sido caracterizado como sensible a estrés osmótico, las plántulas *tos1* no modificaron su contenido de JAs en respuesta a manitol.

En el mutante *tss1*, caracterizado como hipersensible a estrés iónico, la ausencia de respuesta a manitol y la leve acumulación sólo de JA por efecto de NaCl no serían modificaciones suficientes para inducir mecanismos de tolerancia a estrés. Los análisis cinéticos de JAs en hojas de cebada estresadas revelaron que un umbral mínimo de estos compuestos es necesario para inducir la expresión de genes que responden a JA (Kramell y col. 2000).

El mutante *tss2*, a pesar de haber sido caracterizado como hipersensible a estrés iónico y osmótico, respondió diferencialmente a NaCl y manitol. El estrés osmótico causó una mayor respuesta expresada a través del importante incremento en el contenido de ambos hidroxilados, indicando una modificación en el metabolismo de JAs.

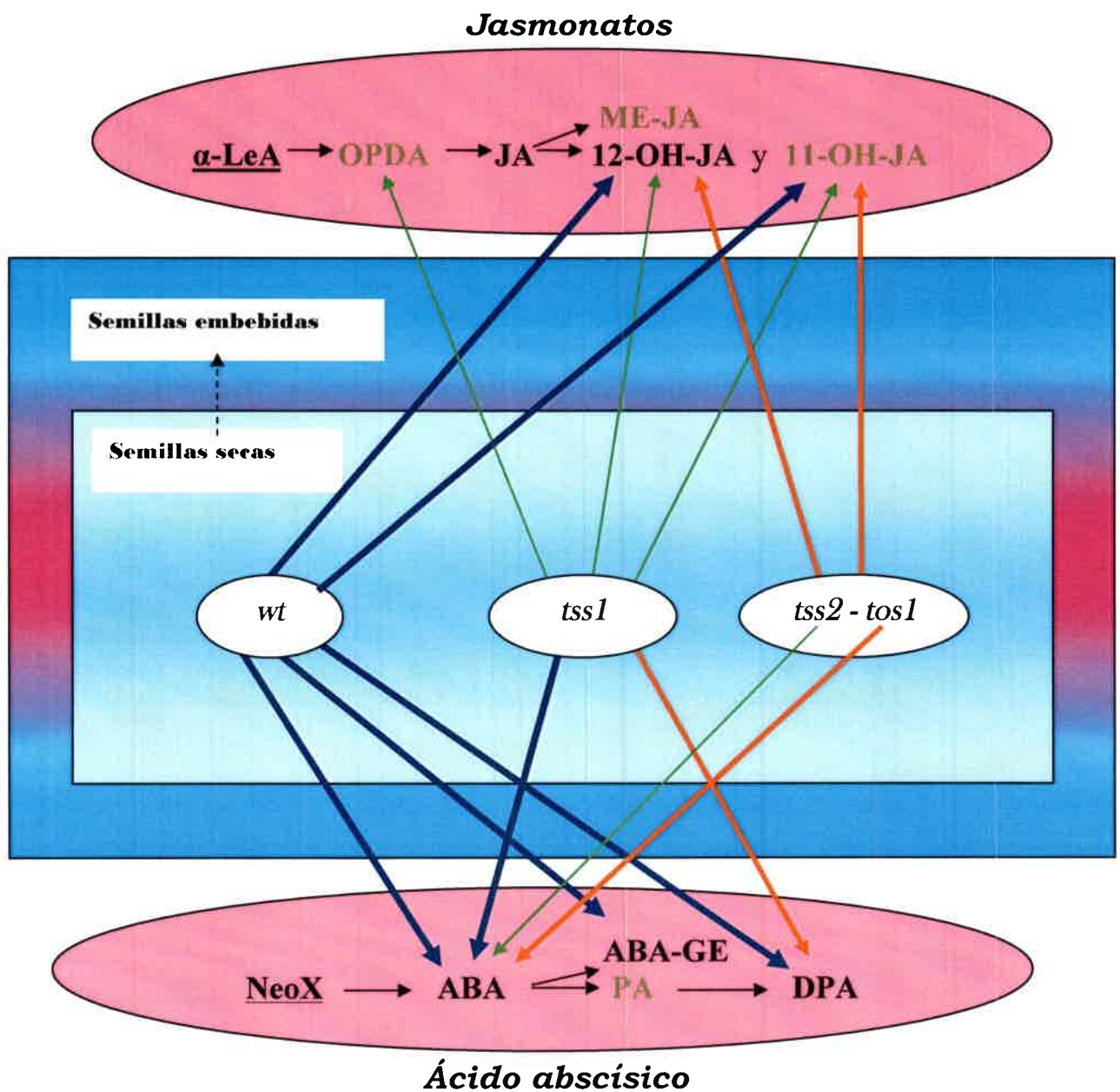
De este modo, en respuesta a NaCl las plántulas wt y mutantes modificaron diferencialmente el contenido de JAs de acuerdo a su tolerancia a estrés. En base a lo observado en el wt y en *tss1*, la activación de la vía de síntesis de JAs en respuesta a NaCl concuerda con lo informado por Pedranzani y col. (2003) respecto a la acumulación de mRNA-LOX y mRNA-AOS luego del tratamiento salino. Sin embargo, en *tss2* y *tos1* la disminución de JAs por efecto de NaCl podría ser consecuencia de la regulación negativa de alguna de las enzimas de la vía de síntesis de estos compuestos, lo cual impediría a estos mutantes activar los mecanismos de respuestas a estrés en los que están involucrados los JAs. En la literatura existen antecedentes que mencionan la regulación a nivel



transcripcional y postranscripcional de las enzimas AOS, AOC y OPR3 (Hause y col. 2000; Maucher y col. 2000; Ziegler y col. 2000) que definirían el patrón de acumulación temporal de estos compuestos (Kramell y col. 2000; Stenzel y col. 2002). Finalmente, se reconoce un efecto más evidente de NaCl sobre el metabolismo de JAs y posiblemente sobre la regulación de sus enzimas respecto al producido por manitol.

Fig. 24. Modelo propuesto de la dinámica hormonal entre JAs, ABA y sus derivados en un cv. silvestre de tomate y sus mutantes en relación a la sensibilidad de estos germoplasmas a estrés.





Para cada germoplasma, las flechas **azules** señalan altos niveles de los compuestos presentes; las flechas **rojas**, niveles medios de los compuestos, y las flechas **verdes** bajos niveles. Los compuestos que no mostraron cambios significativos en sus niveles están representados en **marrón**. Los compuestos subrayados son precursores y no fueron cuantificados en este estudio. La flecha **negra discontinua** señala la disminución general de los niveles hormonales luego del proceso de imbibición.

Nota: Sólo las hormonas y los metabolitos que fueron monitoreados en este estudio se incluyen en la vía de síntesis de JAs y ABA.



Conclusiones

- Los diferentes "sellos oxilipina" en semillas secas, embebidas y plántulas de tomate reflejarían los cambios hormonales durante la germinación y crecimiento temprano, indicando que miembros de la familia de los JAs integran complejas vías de señalización en procesos normales (transformación de semilla a plántula) o en respuesta a estrés (abiótico).
- El hallazgo de las formas hidroxiladas de JA en semillas secas y embebidas, y en plántulas, así como también en respuesta a estrés salino y osmótico, abre un interesante panorama a investigar acerca del papel de estos compuestos en diversos procesos fisiológicos.
- La modificación en los niveles de JAs de plántulas wt y mutantes hipersensibles en respuesta a estrés salino y osmótico, revela una regulación diferencial de algún componente de la vía de síntesis de estos compuestos.
- Las semillas de los mutantes *tss1*, *tss2* y *tos1* contienen un nivel basal inferior de ABA y de las formas hidroxiladas de JA comparado con las wt, por lo que se propone una fuerte correlación entre niveles endógenos de estos compuestos y sensibilidad a estrés de los mutantes.
- La vía catabólica por hidroxilación fue la predominante, debido a la mayor abundancia de 12-OH-JA en semillas secas y de DPA en semillas embebidas.
- En semillas secas la hidroxilación constituiría una vía de total inactivación de la señalización de JAs, tal como ocurre en mamíferos.
- Los niveles de metabolitos de ABA presentes en semillas secas ponen de manifiesto que tanto la vía hidroxilativa como glucosilativa estuvieron presentes durante la fase de embriogénesis temprana.
- El proceso de germinación sería regulado conjuntamente por la difusión de ABA endógeno hacia el medio de imbibición, la síntesis *de novo* y el metabolismo en la semilla, y la sensibilidad diferencial de los germoplasmas.



- La aplicación exógena confirma el rol inhibitorio de JA y ABA en la germinación.

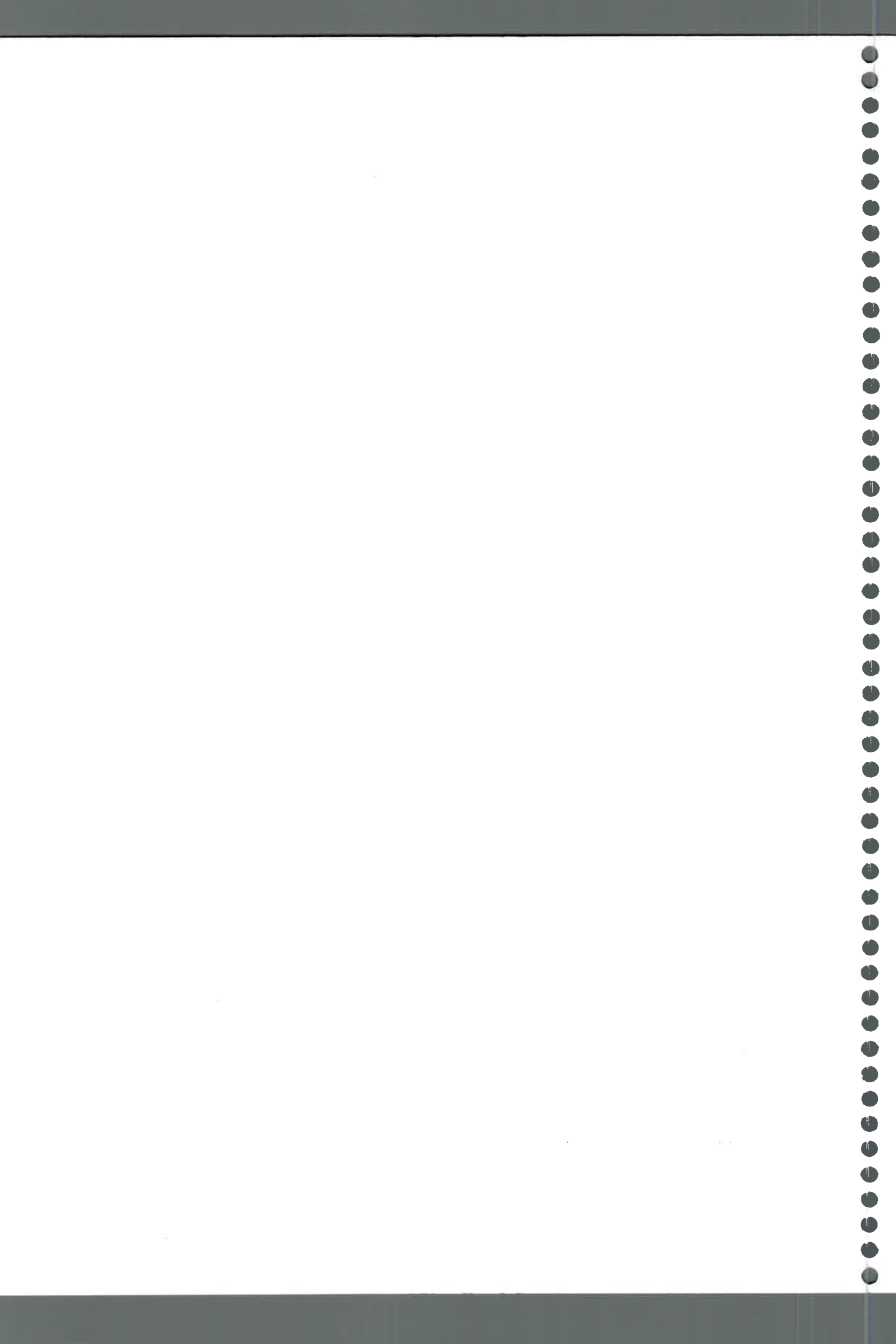




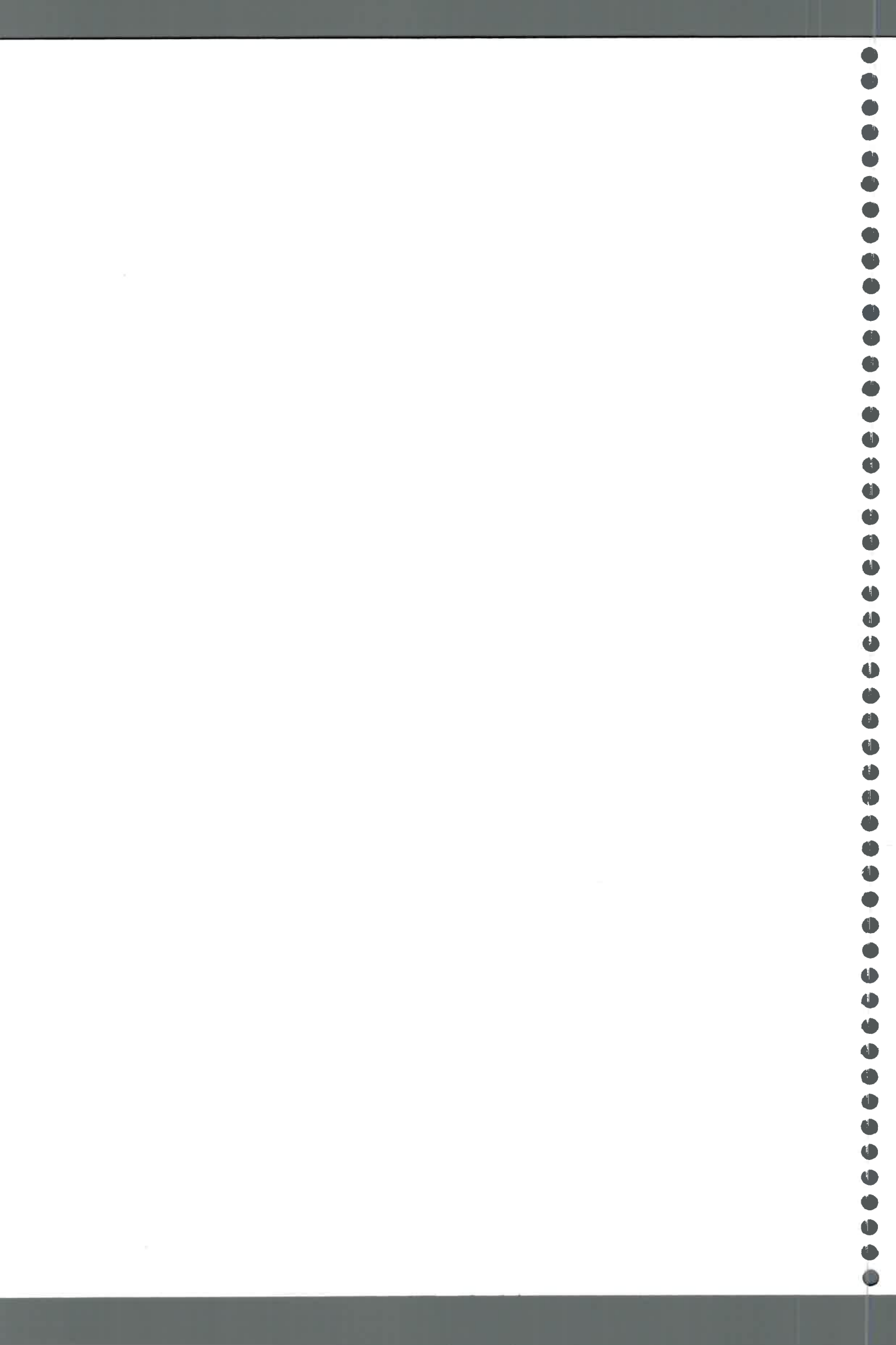
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Abdala G., Miersch O., Kramell R., Vigliocco A., Agostini E., Forchetti G., Alemanno S.** 2003 Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Plant Growth Regul.* 40: 21-27.
- Addicott FT., Carns HR., Lyon JL., Smith OE., McMeans JL.** 1964 On the physiology of abscission. En: *Regulateurs naturels de la croissance vegetale.* Nitsch JP. (Ed.) Paris: *Cent. Nat. Rech. Sci.* pp. 687-703.
- Andrade AM.** 2001 Caracterización de dos cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) en condiciones de salinidad, durante las etapas de germinación y crecimiento temprano. Trabajo final presentado para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Andrade AM., Vigliocco A., Alemanno S., Miersch O., Botella MA., Abdala G.** 2005 Endogenous jasmonates and octadecanoids in hypersensitive tomato mutants during germination and seedling development in response to abiotic stress. *Seed Science Research* 15: 309–318.
- Andrade AM., Masciarelli O., Alemanno S., Luna V., Abdala G.** 2007 Tomato mutants sensitive to abiotic stress display different ABA levels and metabolism during germination. Enviado a *Plant and Cell Physiology*.
- Bate NJ., Rothstein SJ.** 1998 C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.* 16: 561-569.
- Berger S.** 2002 Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta* 214: 497-504.
- Berry T., Bewley JD.** 1992 A role for the surrounding fruit tissues in preventing germination of (*Lycopersicon esculentum*) seeds: a consideration of osmotic environment and abscisic acid. *Plant Physiol.* 100: 951-957.



- Blechert S., Bockelmann C., Füllein M., von Schrader T., Stelmach BA., Nielsen U., Weiler EW.** 1999 Structure-activity relationships reveal two subgroups of active octadecanoids in elicitation of the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Planta* 207: 470-479.
- Blée E., Joyard J.** 1996 Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110: 445-454.
- Blée E.** 1998 Phyto-oxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res.* 37: 33-72.
- Blée E.** 2002 Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7: 315-321.
- Borsani O., Cuartero J., Fernández JA., Valpuesta V., Botella MA.** 2001 Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *The Plant Cell* 13: 873-888.
- Borsani O., Cuartero J., Fernández JA., Valpuesta V., Botella MA.** 2002 Tomato *tos1* mutation identifies a gene essential for osmotic tolerance and abscisic acid sensitivity. *Plant J.* 32: 905-914.
- Carles C., Bies-Etheve N., Aspart L., Leon-Kloosterziel KM., Koornneef M., Echeverría M., Delseny M.** 2002 Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes: Role of ABI5. *Plant J.* 30: 373-383.
- Cenzano A., Vigliocco A., Miersch O., Abdala G.** 2005 Hydroxylated levels during stolon to tuber transition in *Solanum tuberosum* L. *Potato Research* 48: 107-115.
- Cenzano A., Abdala G., Hause B.** 2007 Cytochemical immuno-localization of allene oxide cyclase, a jasmonic acid biosynthetic enzyme, in developing potato stolons. *J. Plant Physiol.* En prensa. DOI: 10.1016/j. jplph.2006. 10. 007.



Chiwocha S., Abrams S., Ambrose S., Cutler A., Loewen A., Ross A., Kermode A. 2003 A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* 35: 405-417.

Chiwocha S., Cutler A., Abrams SR., Ambrose SJ., Yang J., Ross ARS., Kermode AR 2005 The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J.* 42: 35-48.

Creelmann RA., Mullet JE. 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.

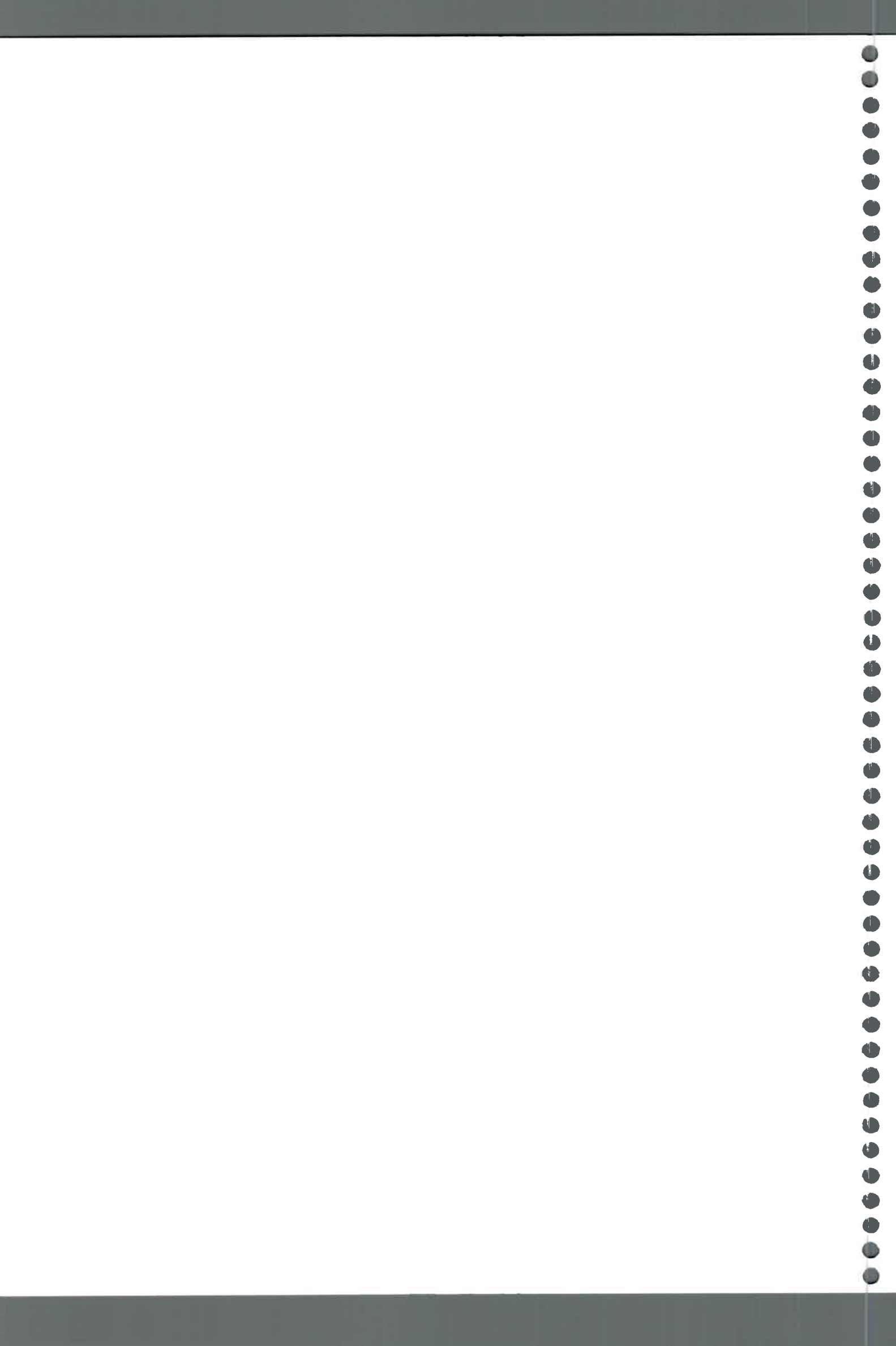
Creelman RA., Mullet JE. 1997 Oligosaccharins, brassinolides and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9: 1211-1223.

Cutler AJ., Krochko JE. 1999 Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4: 472-478.

Delk N., Johnson K., Chowdhury N., Braam J. 2005 *CLM24* regulated expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca^{2+} sensor that functions in responses to Abscisic Acid, day length, and ion stress. *Plant Physiol.* 139: 240-253.

Dietz K-J., Sauter A., Wichert K., Messdaghi D., Hartung W. 2000 Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J Exp Bot.* 51: 937-944.

Falkenstein E., Groth B., Mithofer A., Weiler EW. 1991 Methyljasmonate and α -linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. *Planta* 185: 316-322.



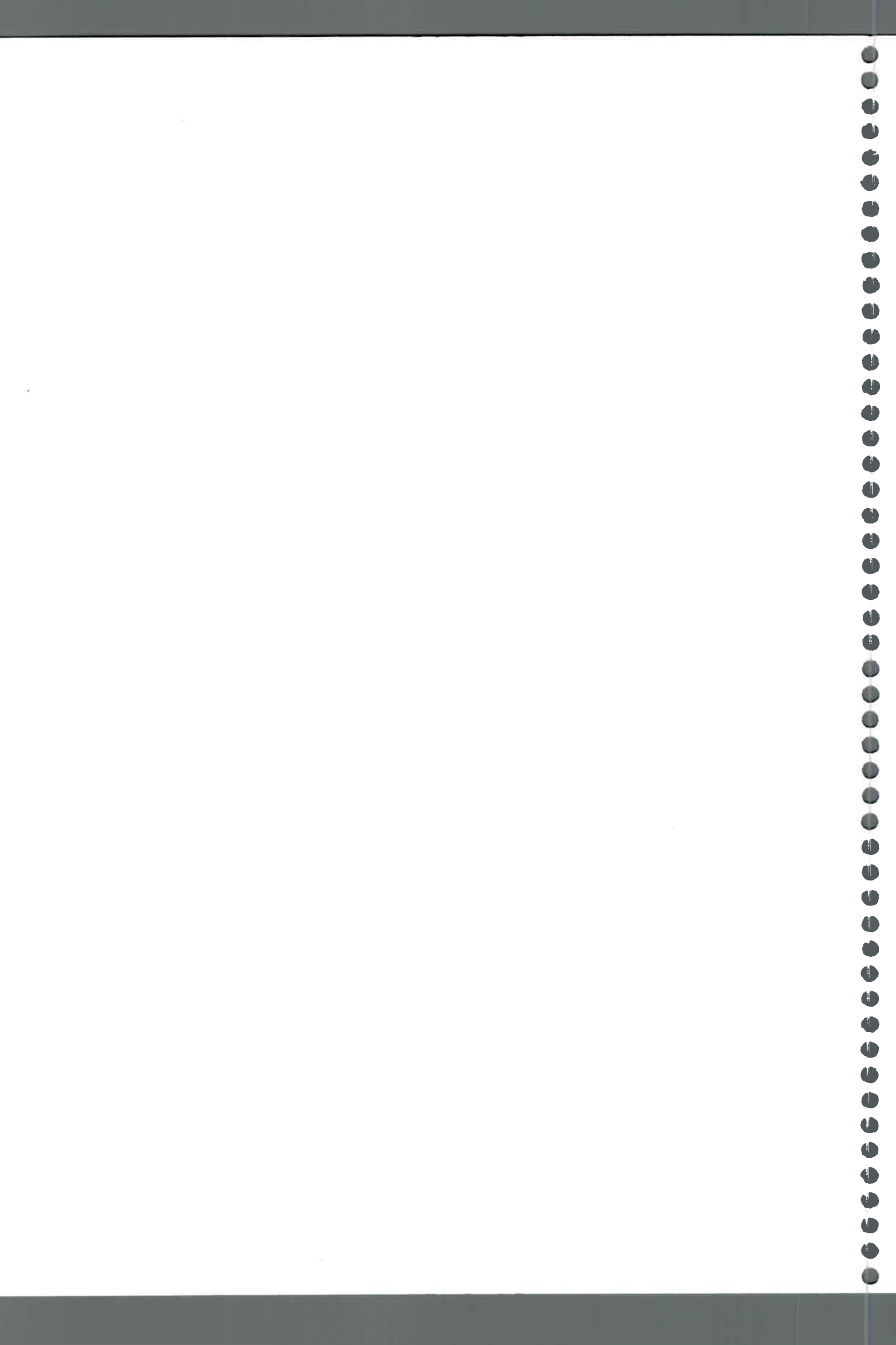
- Farmer EE., Ryan CA.** 1992 Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134.
- Feussner I., Hause B., Vörös K., Parthier B., Wasternack C.** 1995 Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplast of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant J.* 7: 949–957.
- Feussner I., Kuhn H., Wasternack C.** 2001 Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* 6: 268-273.
- Feussner I., Wasternack C.** 2002 The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 53: 275-297.
- Finkelstein R., Gampala S., Rock C.** 2002 Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15-S45.
- Frey A., Godin B., Bonnet M., Sotta B., Marion-Poll A.** 2004 Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218: 958-964.
- Gidda SK., Miersch O., Levitin A., Schmidt J., Wasternack C., Varin L.** 2003 Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 17895-17900.
- Grappin P., Bouinot D., Sotta B., Miginiac E., Jullien M.** 2000 Control of seeds dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: Post-imbibition Abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* 210: 279-285.
- Grechkin AN., Fasliev FN., Mukhtarova LS.** 1995 The lipoxygenase pathway in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins. *FEBS Lett.* 371: 159-162.



- Grechkin AN., Mukhtarova LS., Hamberg M.** 2000 The lipoxygenase pathway in tulip (*Tulipa gesneriana*): detection of the ketol route. *Biochem J.* 352: 501-509.
- Hamberg M.** 1998 A pathway for biosynthesis of divinyl ether fatty acids in green leaves. *Lipids* 33: 1061-1071.
- Hamberg M.** 2000 New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. *Lipids* 35: 353-363.
- Hause B., Stenzel I., Miersch O., Maucher H., Kramell R.** 2000 Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: alene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J.* 24: 113-126.
- Hause B., Maier W., Miersch O., Kramell R., Strack D.** 2002 Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol.* 130: 1213-1220.
- Hause B., Stenzel I., Miersch O., Wasternack C.** 2003 Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* 64: 971-980.
- Heitz T., Bergey DR., Ryan CA.** 1997 A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 114: 1085-1093.
- Helder H., Miersch O., Vreugdenhil, Sembdner G.** 1993 Occurrence of hydroxylated jasmonic acids in leaflets of *Solanum demissum* plants grown under long- and short-days conditions. *Physiol. Plant.* 88: 647-653.
- Hildebrand DF., Fukushige H., Afithile M., Wang C.** 1998 Lipoxygenases in plant development and senescence. En: *Eicosanoids and related compound in plant and animals*. Rowley AF., Kuhn H., Schewe T. (Eds) London, UK: Portland, pp. 151-181.



- Hirai N.** 1999 Abscisic Acid. En: *Comprehensive Natural Product Chemistry*. Barton D., Nakanishi K., Meth-Cohn O. (Eds) Pergamon, Oxford, pp. 2-91.
- Hoad GV.** 1995 Transport of hormones in the phloem of higher plants. *Plant Growth Regul.* 16: 73-182.
- Howe GA., Lee GI., Itoh A., Li L., DeRocher AE.** 2000 Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol.* 123: 711-724.
- Howe GA., Schillmiller AL.** 2002 Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 230-236.
- Hunter DA., Ferrante A., Vernieri P., Reid MS.** 2004 Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* "Dutch Master"). *Physiol. Plant.* 121: 313-321.
- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K.** 2001 The defective in anther dehiscence 1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 191-209.
- Itoh A., Howe GA.** 2001 Molecular cloning of a divinyl ether synthase. *J. Biol. Chem.* 276: 3620-3627.
- Itoh A., Schillmiller AL., McCaig BC., Howe G.** 2002 Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *J. Biol. Chem.* 277: 46051-46058.
- Jacobsen JV., Pearce DW., Poole AT., Pharis R., Mander LN.** 2002 Abscisic acid, Phaseic acid and Gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol. Plant.* 115: 428-441.



- Karssen C., Brinkhorst-van der Swan D., Breekland A., Koornneef M.** 1983 induction of dormancy during seed development by endogenous Abscisic acid: Studies of Abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 157: 158-165.
- Koda Y.** 1992 The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *Int. Rev. Cytol.* 135: 155-199.
- Koornneef M., Bentsink L., Hilhorst H.** 2002 Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.
- Kolomiets MV., Hannapel DJ., Chen H., Tymeson M., Gladon RJ.** 2001 Lipoygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13: 613-626.
- Kovaleva LV., Zakharova EV.** 2003 Hormonal status of the pollen-pistil system at the programic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* (L.) *Sex Plant Reprod.* 16: 191-196.
- Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kimatura S., Asami T., Hirai N., Koshiba T., Kamiya Y., Nambara E.** 2004 The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.* 23: 1647-1656.
- Kramell R., Atzorn R., Schneider G., Miersch O., Brückner C., Schmidt J., Sembdner G., Parthier B.** 1995 Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Plant Growth Regul.* 14: 29-36.
- Kramell R., Miersch O., Atzorn R., Parthier B., Wasternack C.** 2000 Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol.* 123: 177-187.



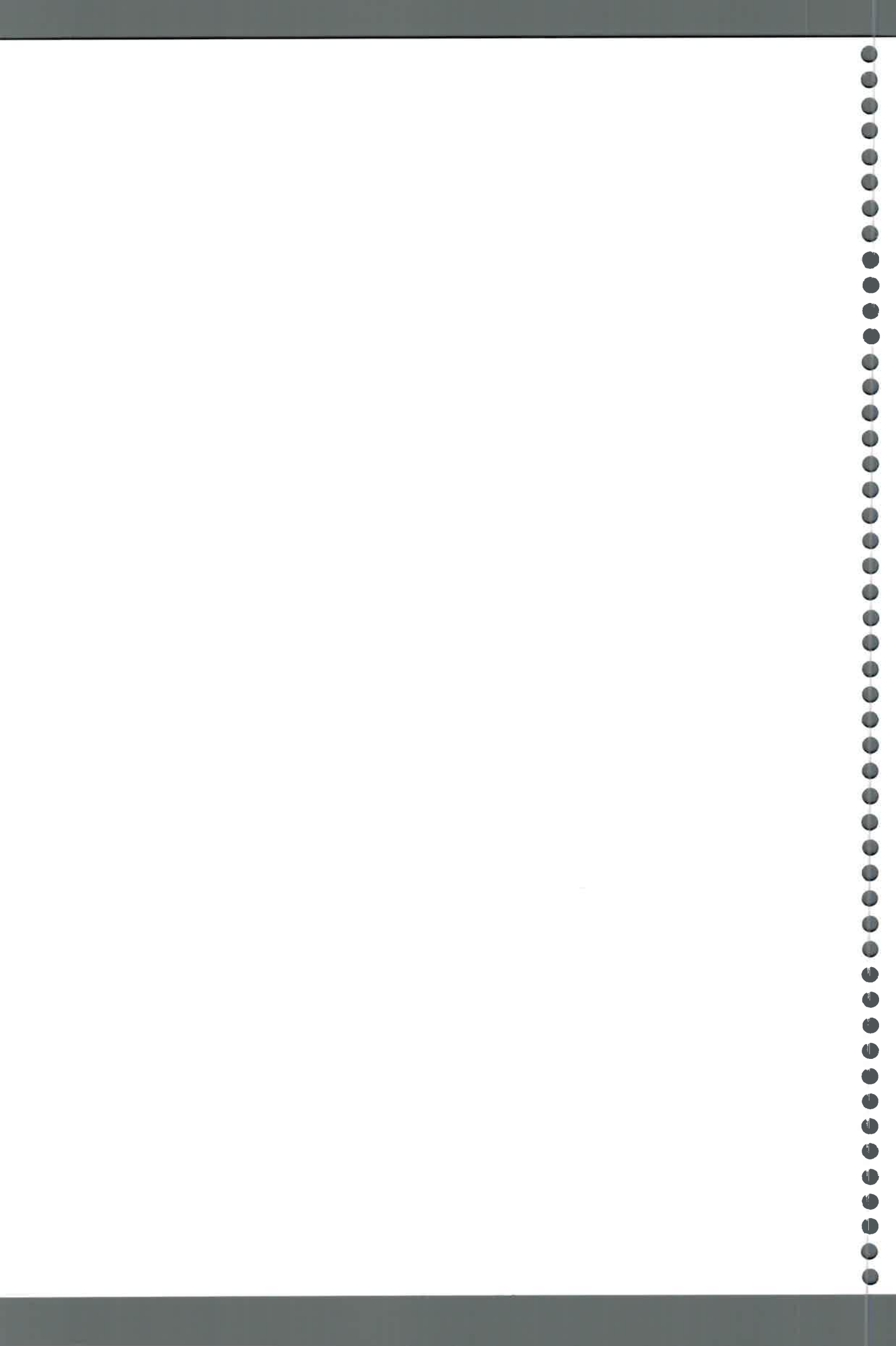
- Laudert D., Weiler EW.** 1998 Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 15: 675-684.
- Lehmann J., Atzorn R., Brückner C., Reinbothe S., Leopold J., Wasternack C., Parthier B.** 1995 Accumulation of Jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197: 156-162.
- Leopold J., Hause B., Lehmann J., Graner A., Parthier B., Wasternack C.** 1996 Isolation, characterization and expression of a cDNA coding for a jasmonate-inducible protein of 37 kD in barley leaves. *Plant Cell Environ.* 19: 675-684.
- Leubner-Metzger G., Fründt C., Vögeli-Lange R., Meins F. Jr.** 1995 Class I β -1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol.* 109: 751-759.
- Leubner-Metzger G., Meins F. Jr.** 2000 Sense transformation reveals a novel role for class I β -1,3-glucanases in tobacco seed germination. *Plant J.* 23: 215-221.
- Leung J., Giraudat J.** 1998 Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222.
- Li C., Schillmiller AL., Liu G., Lee GI., Jayanty S., Sageman C., Urebolov J., Giovannoni JJ., Yagi K., Kobayashi Y., Howe GA.** 2005 Role of α -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic signalling in tomato. *Plant Cell* 17: 971-986.
- Liu J., Zhu JK.** 1997 An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14960-14964.



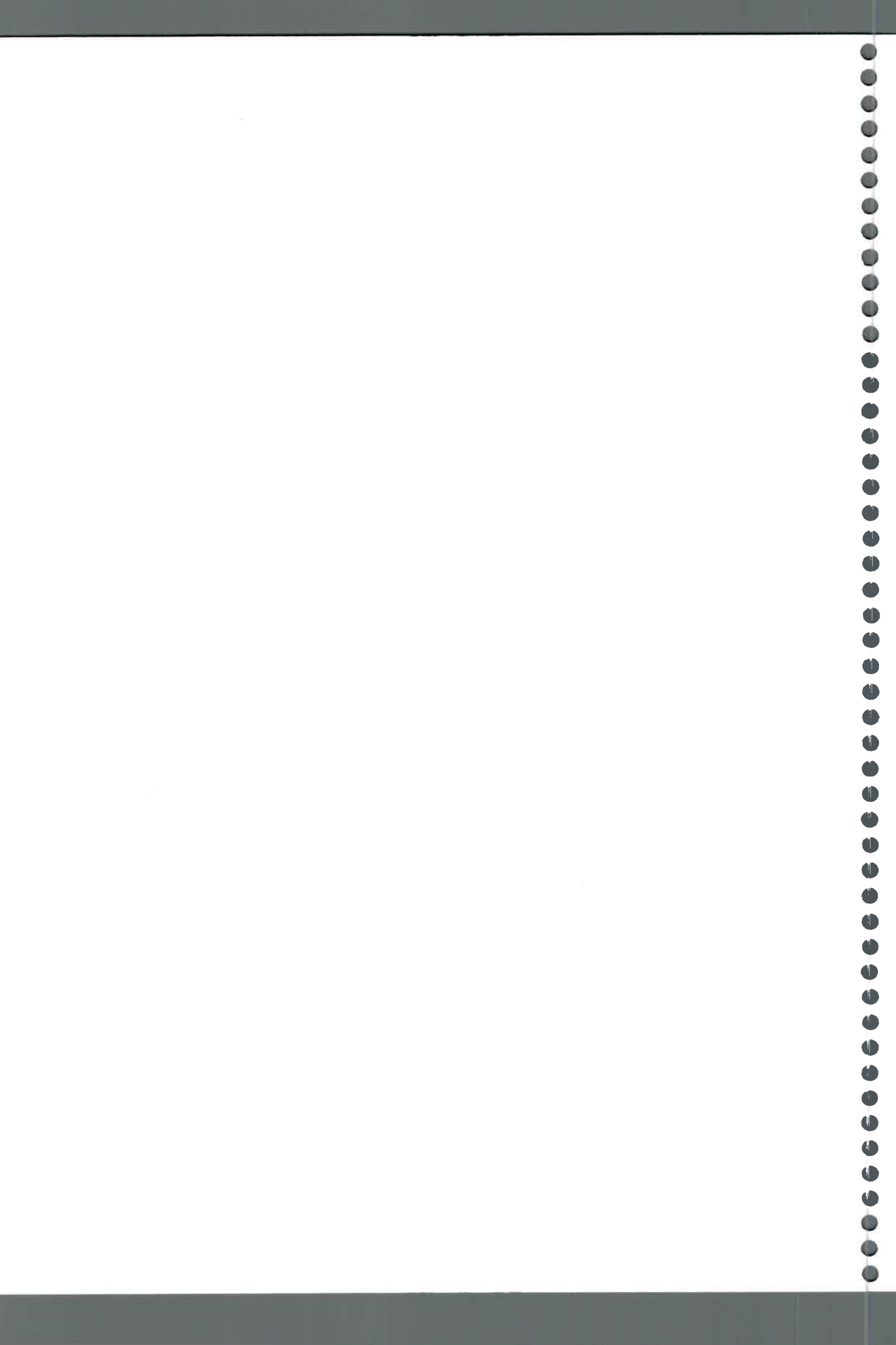
- López-Molina L., Mongrand S., Chua NH.** 2001 A post-germination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 4782-4787.
- Luna MV., Soriano MD., Bottini R., Sheng Ch., Pharis RD.** 1993 Levels of endogenous gibberellins, abscisic acid, indol 3 acetic acid and naringenin during dormancy of peach flower buds. *Acta Horticulturae* 329: 265-267.
- Mandaokar A., Kumar VD., Amway M., Browse J.** 2003 Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development. *Plant Mol. Biol.* 4: 775-86.
- Maucher H., Hause B., Feussner I., Ziegler J., Wasternack C.** 2000 Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome)-tissue specific regulation in seedling development. *Plant J.* 21: 199-213.
- McCourt P.** 2001 Plant hormone signalling: Getting the message out. *Mol. Cell* 8: 1157-1158.
- Miersch O., Schneider G., Sembdner G.** 1991 Hydroxylated jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochem.* 30: 4049-4051.
- Miersch O., Knöfel HD., Schmidt J., Kramell R., Parthier B.** 1998 A jasmonic acid conjugate, N[(-)-jasmonoyl]-tyramine, from *Petunia* pollen. *Phytochem.* 47: 327-329.
- Miersch O., Kramell R., Parthier B., Wasternack C.** 1999 Structure-activity relations of substituted, deleted or stereospecifically altered jasmonic acid in gene expression of barley leaves. *Phytochem.* 50: 353-361.
- Millar A., Jacobsen J., Ross J., Helliwell C., Poole A., Scofield G., Reid J., Gubler F.** 2006 Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* 45: 942-954.



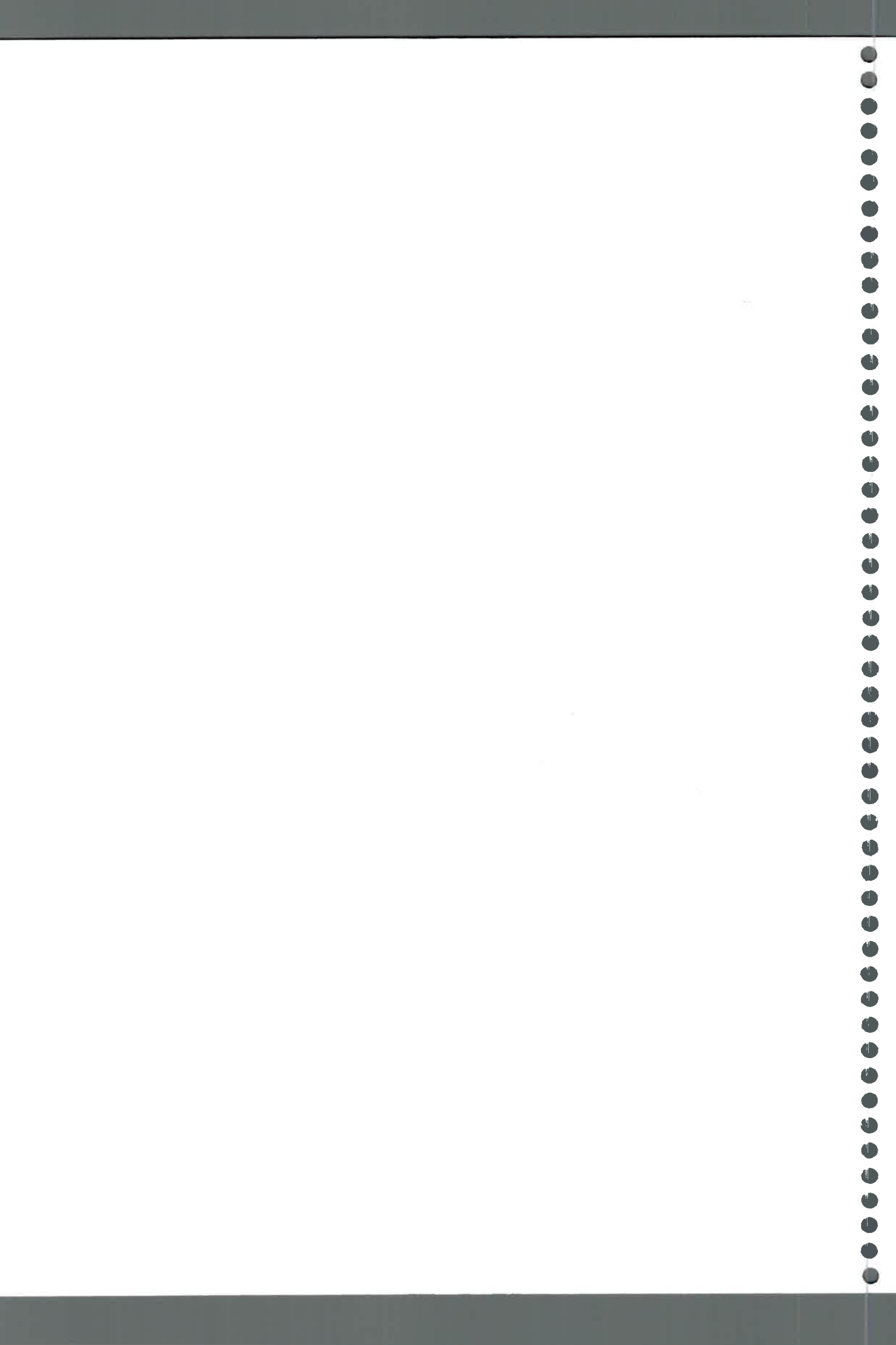
- Mohr P., Cahill D.** 2003 Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. Tomato and *Peronospora parasitica*. *Funct. Plant Biol.* 30: 461-469.
- Moller SG., Chua NH.** 1999 Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J. Mol. Biol.* 293: 219-234.
- Moons A., Princen E., Bauw G., Van Montagu M.** 1997 Antagonist effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* 9: 2243-2259.
- Müssig C., Biesgen C., Lisso J., Uwer U., Weiler EW., Altmann T.** 2000 A novel stress-inducible 12-oxophytodi-enoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between Brassinosteroid-action and Jasmonic-acid synthesis. *Plant Physiol.* 157: 143-152.
- Nambara E., Marion-Poll A.** 2003 ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8: 213-217.
- Nambara E., Marion-Poll A.** 2005 Abscisic Acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 56: 165-185.
- Ni B-R., Bradford KJ.** 1993 Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin- deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiol.* 101: 607-617.
- O' Donnell PJ., Atzorn R., Wasternack C., Leyser HMO., Bowles DJ.** 1996 Ethylene as a signal mediating the wound response to tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.
- Okasabe Y., Maruyama K., Seki M., Satou M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 2005 Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of Abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1105-1119.



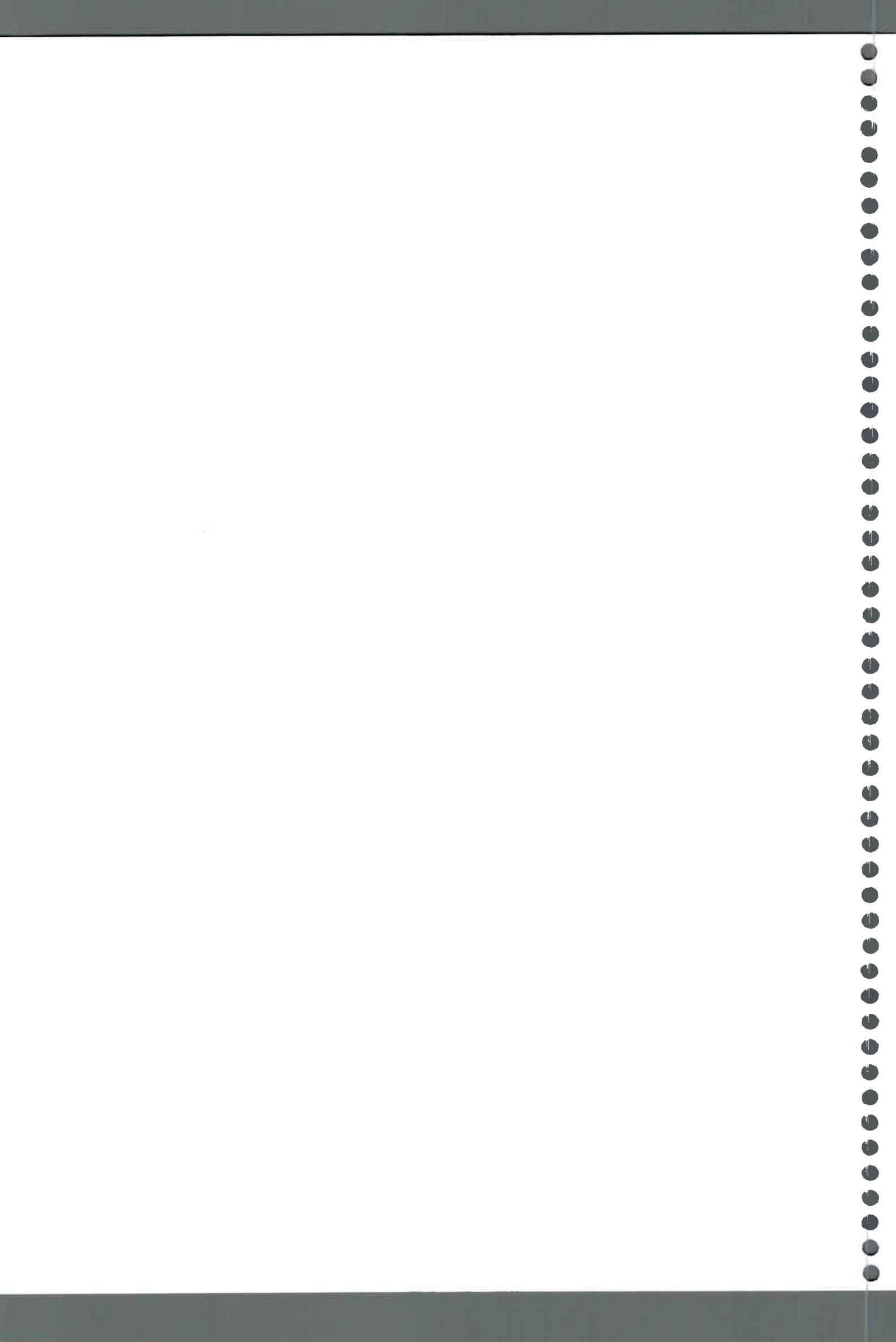
- Oritani T., Kiyota H.** 2003 Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Nat. Prod Rep.* 20: 414-425.
- Orozco-Cárdenas ML., Ryan CA.** 1999 Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6553-6557.
- Orozco-Cárdenas M., Narváez-Vásquez J., Ryan CA.** 2001 Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13: 179-191.
- Parthier B.** 1991 Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypothesis on their actions. *Bot. Acta* 104: 446-454.
- Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan CA.** 1991 A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.
- Pedranzani H., Racagni G., Alemano S., Miersch O., Ramírez I., Peña-Cortés H., Taleisnik E., Machado-Domenech E., Abdala G.** 2003 Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul.* 41: 149-148.
- Pelacho AM., Mingo-Castel AM.** 1991 Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured in vitro. *Plant Physiol.* 97: 1253-1255.
- Peña-Cortés H., Willmitzer L.** 1995 Role of hormones in gene activation in response to wounding. En: *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Davies PJ. (Ed.) Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, pp. 395-414.



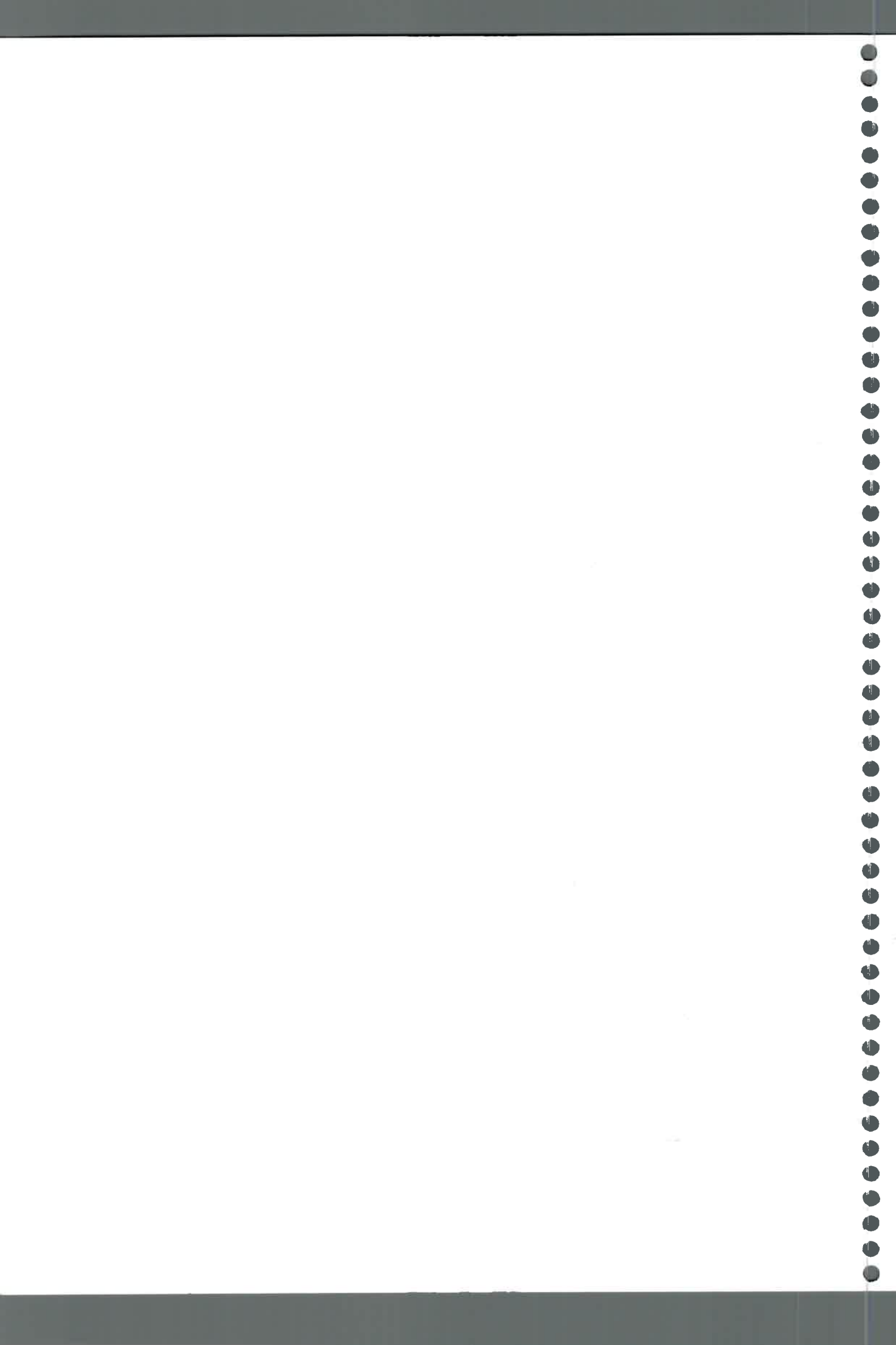
- Robertson AJ., Ishikawa M., Gusta LV., MacKenzie SL.** 1994 Abscisic acid-induced heat tolerance in *Bromus inermis* (L) cell-suspension cultures. Heat-stable, abscisic acid-responsive polypeptides in combination with sucrose confer enhanced thermostability. *Plant Physiol.* 105: 181-190.
- Rock C., Quatrano R.** 1995 The roles of hormones during seed development. En: *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Davies PJ. (Ed.) Kluwer, Norwell, Massachusetts, USA, pp. 671-697.
- Rock C.** 2000 Pathways to Abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357-396.
- Rohde A., Kurup S., Holdsworth M.** 2000 *ABI3* emerges from the seeds. *Trends Plant Sci.* 5: 418-419.
- Royo J., Vancanneyt G., Pérez AG., Sanz C., Störmann K., Rosal S., Sánchez-Serrano JJ.** 1996 Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated gene expression. *J. Biol. Chem.* 271: 21012-21019.
- Rustérucci C., Montillet JL., Agnel JP., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule JJ., Etienne P., Suty L., Blein JP., Triantaphylidés C.** 1999 Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* 274: 36446-36455.
- Satler SO., Thimann KV.** 1981 Le jasmonate de méthyle: nouveau et puissant promoteur de la sénescence des feuilles. *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. III* 293: 735-740.
- Sauter A., Abrams SR., Hartung W.** 2002 Structural requirements of abscisic acid (ABA) and its impact on water flow during radial transport of ABA analogues through maize roots. *Plant Growth Regul.* 21: 50-59.



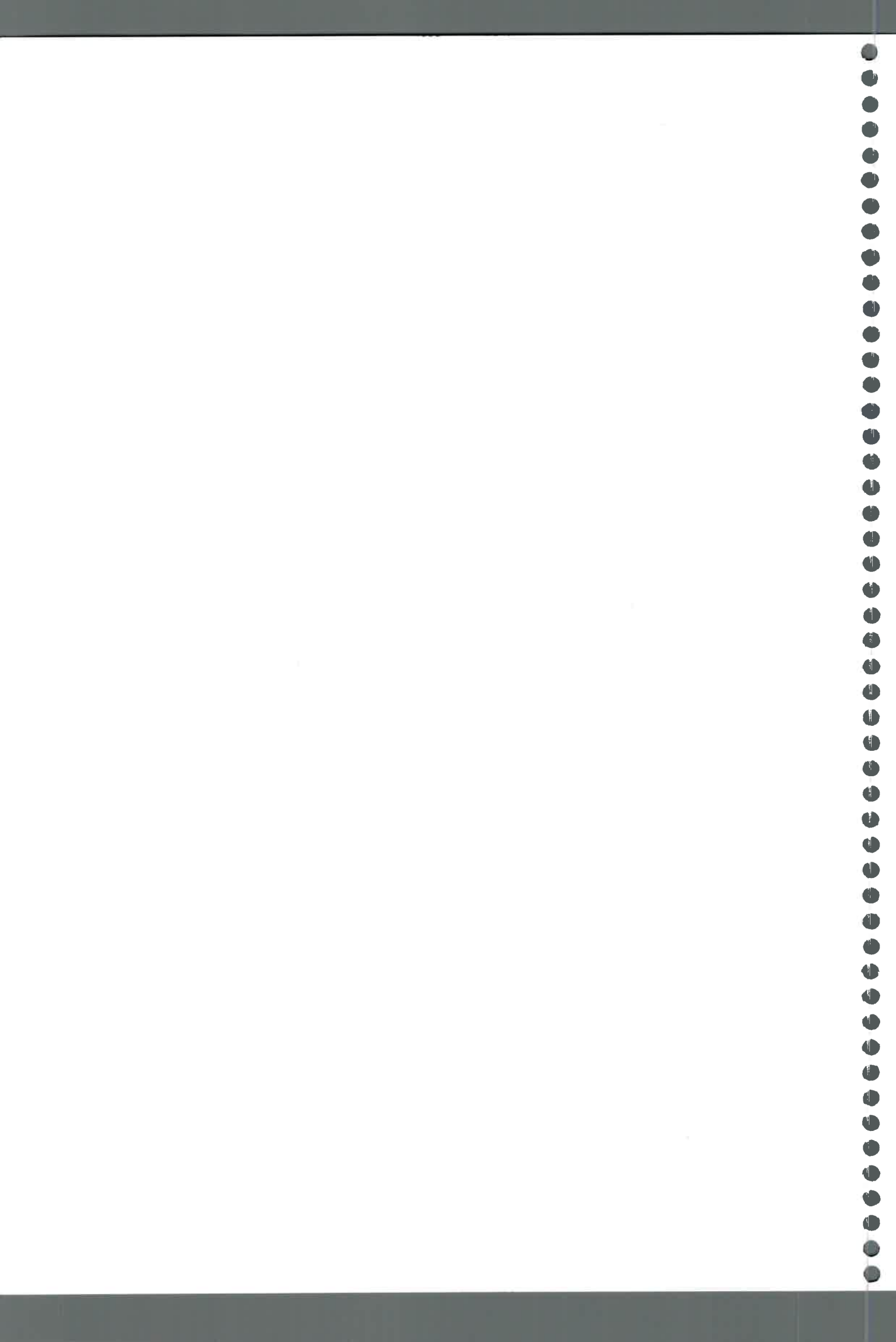
- Schaller F., Biesgen C., Mussig C., Altmann T., Weiler EW.** 2000 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210: 979-984.
- Schaller F.** 2001 Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* 52: 11-23.
- Schewe T.** 1998 Basic function of lipoxygenases and their products in higher plants. En: *Eicosanoids and related compounds in plants and animals*. Rowley AF., Kuhn H., Schewe T. (Eds.) Princeton University Press, Princeton, N.Y., pp. 133-150.
- Schwartz SH., Qin X., Zeevaart JAD.** 2003 Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiol.* 131: 1591-1601.
- Schwartz SH., Zeevaart JAD.** 2004 Abscisic acid biosynthesis and metabolism. En: *Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Davies PJ. (Ed.) Cornell University, NY, USA, pp. 137-155.
- Sembdner G., Gross D.** 1986 Plant growth substances of plant and microbial origin. En: *Plant Growth Substances*. Bopp M. (Ed.) Berlin, pp. 139-147.
- Sembdner G., Meyer A., Miersch O., Brückner C.** 1990 Metabolism of jasmonic acid. En: *Plant Growth Substances*. Bopp M. (Ed.) Berlin, pp. 374-379.
- Seo M., Koshiba T.** 2002 Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 41-48.
- Setha S., Kondo S., Hirai N., Ohigashi H.** 2005 Quantification of ABA and its metabolites in sweet cherries using deuterium-labeled internal standards. *Plant Growth Regul.* 45: 183-188.



- Shinozaki K., Yamaguchi- Shinozaki K.** 1996 Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:161-167.
- Sivasankar S., Sheldrick B., Rothstein SJ.** 2000 Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.* 122: 1335-1342.
- Song WC., Funk CD., Brash AR.** 1993 Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acids hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8519-8523.
- Staswick PE., Su WP., Howell SH.** 1992 Methyl jasmonate inhibition of root-growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6837-6840.
- Steel RGD., Torrie JH.** 1995 *Bioestadística: Principios y Procedimientos, 2nd edn.* Spain: McGraw-Hill.
- Stenzel I., Hause B., Maucher H., Pitzschke A., Miersch O., Ziegler J., Ryan CA., Wasternack C.** 2002 Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle specific generation of jasmonates in tomato - Amplification in wound-signalling. *Plant J.* 33: 577-589.
- Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kramell R., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I., Wasternack C.** 2003 Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 51: 895-911.
- Stintzi A., Browse J.** 2000 The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10625-10630.



- Strassner J., Schaller F., Frick UB., Howe GA., Weiler EW., Amrhein N., Macheroux P., Schaller A.** 2002 Characterization and cDNA-microarray expression analysis of the 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J.* 32: 585-601.
- Taylor IB., Burbidge A., Thompson AJ.** 2000 Control of Abscisic acid synthesis. *J. Exp. Bot.* 51: 1563-1574.
- Todoroki Y., Hirai N., Ohigashi H.** 2000 Analysis of isomerization process of 8'-hydroxyabscisic acid and its 3'-fluorinated analog in aqueous solutions. *Tetrahedron* 56: 1649-1653.
- Toorop PE., van Aelst AC., Hilhorst HWM** 2000 The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. *J. Exp. Bot.* 51: 1371-1379.
- Turner JG., Ellis C., Devoto A.** 2002 The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: S153-S164.
- Valpuesta V., Botella MA.** 2007 Identificación de genes esenciales para la tolerancia a estrés hídrico y salino. Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología Vegetal. Universidad de Málaga. España.
<http://www.bmbq.uma.es/lbbv/tomate.htm>.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P., Sánchez-Serrano JJ.** 2001 Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8139-8144.
- van den Wijngaard PWJ., Sinnige MP., Roobeek I., Reumer A., Schoonheim PJ., Mol JNM., Wang M., De Boer AH.** 2005 Abscisic acid and 14-3-3 proteins control K channel activity in barley embryonic root. *Plant J.* 41: 43-55.



- Vijayan P., Shockey J., Lévesque C., Cook R., Browse J.** 1998 A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7209-7214.
- Vörös K., Feussner I., Kühn H., Lee J., Graner A., Löbner M., Parthier B., Wasternack C.** 1998 Characterization of methyl jasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *Eur. J. Biochem.* 251: 36-44.
- Wallis JG., Browse J.** 2002 Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog Lipid Res.* 41: 254-278.
- Walton DC., Li Y.** 1995 Abscisic acid biosynthesis and metabolism. En: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies PJ. (Ed.) Kluwer, Norwell, MA, pp. 140-157.
- Wang M., Heimovaara-Dijkstra S., Van Duijn B.** 1995 Modulation of germination of embryos isolated from dormant and non-dormant barley grains by manipulation of endogenous Abscisic acid. *Planta* 195: 586-592.
- Wang Z., Mambelli S., Setter T.** 2002 Abscisic acid catabolism in maize kernels in response to water deficit at early endosperm development. *Ann. Bot.* 90: 623-630.
- Wasternack C., Hause B.** 2002 Jasmonates and octadecanoids - signals in plant stress response and development. En: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. Moldave K. (Ed.) Academic Press New York, pp. 165-221.
- Wasternack C.** 2006 Oxylipins: biosynthesis, signal transduction and action. En: *Plant Hormone Signaling*. Hedden P., Thomas SG. (Eds.) *Annual Plant Rev.* 24: 185-228.
- Weber H., Vick BA., Farmer EE.** 1997 Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Plant Biology* 94: 10473-10478.



- Weber H., Chételat A., Caldelari D., Farmer EE.** 1999 Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11: 485-493.
- Weber H.** 2002 Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 217-224.
- Weiler EW., Kutchan TM., Gorba T., Brodschelm W., Niesel U., Bublitz F.** 1994 The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett.* 345: 9-13.
- Wilén RW., Ewan BE., Gusta LV.** 1994 Interaction of abscisic acid and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance. *Can. J. of Bot.* 72: 1009-1017.
- Wu SJ., Ding L., Zhu JK.** 1996 *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8: 617-627.
- Yamane H., Abe H., Takahashi N.** 1982 Jasmonic acid and methyl ester in pollen and anthers of three *Camellia* species. *Plant Cell Physiol.* 23: 1125-1127.
- Yoshihara T., Omer EA., Koshino H., Sakamura S., Kekuta Y., Koda Y.** 1989 Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* (L) *Agr. Biol. Chem.* 53:2835-2837.
- Yoshioka T., Endo T., Satoh S.** 1998 Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 39: 307-312.
- Xiong L., Zhu JK.** 2003 Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 133: 29-36.



- Xu Z-J., Nakajima M., Suzuki Y., Yamaguchi I.** 2002 Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from Adzuki bean seedlings. *Plant Physiol.* 129: 1285-1295.
- Zaharia LI., Gay Y., Nelson KM., Ambrose SJ., Abrams SR.** 2004 Oxidation of 8'-hydroxy abscisic acid in Black Mexican Sweet maize cell suspension cultures. *Phytochem.* 65: 3199-3209.
- Zaharia LI., Walker-Simmon M., Rodríguez C., Abrams S.** 2005 Chemistry of abscisic acid, abscisic acid catabolites and analogs. *Plant Growth Regul.* 24: 274-284.
- Zeevaart JAD., Milborrow BV.** 1976 Metabolism of abscisic acid and the occurrence of epi-dihydrophaseic acid in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochem.* 15: 493-500.
- Zeevaart JAD., Creelman RA.** 1988 Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 439-473.
- Zeevaart JAD., Rock CD., Fantauzzo F., Heath TG., Gage DA.** 1991 Metabolism of abscisic acid and its physiological implications. En: *Abscisic acid: physiology and biochemistry*. Davies WJ., Jones HG. (Eds.). BIOS Scientific, Oxford, pp. 39-52.
- Zeevaart JAD.** 1999 Abscisic acid metabolism and its regulation. En: *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Hooykass PJJ., Hall MA., Libbenga KR., (Eds.). Elsevier Science, Amsterdam, pp. 189-207.
- Zhou R., Squires TM., Ambrose SJ., Abrams SR., Ross ARS., Cutler A.** 2003 Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A* 1010: 75-85.



Zhou R., Cutler A., Ambrose S.J., Galka M.M., Nelson K.M., Squires T.M., Loewen M.K., Juadhav A.S., Ross A.R., Taylor D.C., Abrams S.R. 2004 A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiol.* 134: 361-369.

Zhu J-K., Liu J., Xiong L. 1998 Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181-1191.

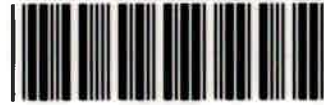
Zhu J.K. 2002 Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53: 247-273.

Ziegler J., Stenzel I., Hause B., Maucher H., Miersch O., Hamberg M., Grimm M., Ganai M., Wasternack C. 2000 Molecular cloning of allene oxide cyclase: The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J. Biol. Chem.* 275: 19132-19138.

Zimmerman D.C., Coudron C.A. 1979 Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-dodecanoic acid. *Plant Physiol.* 63: 536-541.



U.N.R.C.
Biblioteca Central



64415

64415