

## Tesis de Licenciatura

# Análisis de factores nutricionales y hormonales que afectan la tuberización in vitro de papa y su relación con la síntesis de almidón

García, María Julia

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

García, María Julia. (1997). Análisis de factores nutricionales y hormonales que afectan la tuberización in vitro de papa y su relación con la síntesis de almidón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000517\\_Garcia](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000517_Garcia)

Cita tipo Chicago:

García, María Julia. "Análisis de factores nutricionales y hormonales que afectan la tuberización in vitro de papa y su relación con la síntesis de almidón". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000517\\_Garcia](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000517_Garcia)

**EXACTAS**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**“Análisis de factores nutricionales y hormonales  
que afectan la tuberización *in vitro* de papa  
y su relación con la síntesis de almidón”**

Autor: María Julia García

Director: Dra. Silvia Moreno

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
“Fundación Campomar”

Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas

Año: 1997

A mi papá por su cariño,  
paciencia y apoyo incondicional

- A la Dra. Silvia Moreno, quien dirigió esta tesis y guió mis primeros pasos en la investigación con la invaluable dedicación y buena voluntad que son indispensables en todos los comienzos. Por haberme estimulado siempre y brindado todo su afecto y consejos no sólo en el ámbito científico sino, en la vida cotidiana. Especialmente gracias por sus críticas y su paciencia.
- A la Dra. Juana Tandecarz a quien tuve la suerte de conocer y quien posibilitó mi ingreso en su grupo de trabajo. Por haberme guiado largos meses, por las amenas charlas que solíamos sostener, por su calidad humana, por su cariño, por su sinceridad, por preocuparse tanto por la calidad del trabajo de laboratorio como del bienestar y compañerismo de las personas que lo componen. Pero por sobre todas las cosas gracias por su ejemplo.
- A "las chicas del 106", Silvia Bocca, Mara Roset y Flavia Wald con quienes compartí tés, cafés, charlas, chismes, fotos, alegrías, tristezas, risas, llantos, éxitos, fracasos, días hábiles y feriados, buffers, reactivos y millones de cosas que jamás voy a olvidar.
- A todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, en donde me inicié en la investigación científica.
- A mi hermana por haberme prestado su computadora.
- A la señora Liliana Alonso por haberme impreso el seminario en varias oportunidades con la mejor voluntad del mundo.

ADP-glc:	Adenosina 5' difosfato glucosa
BPB:	Azul de bromofenol
Bcip:	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
cpm:	cuentas por minuto
DMF:	dimetilformamida
FDA:	Fosforilasa dependiente de aceptor
FIA:	Fosforilasa independiente de aceptor
FPLC:	cromatografía líquida rápida de proteínas
GA <sub>3</sub> :	giberelina
Glc:	glucosa
glc-1-P:	glucosa -1- fosfato
JA:	ácido jasmónico
KDa:	Kilodaltons
MES:	ácido 2-(N-morfolino) etansulfónico
MS:	Murashige y Skoog
min:	minutos
mv:	milivolts
NBT:	nitro blue tetrasolium
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida
Pi:	fosfato inorgánico
PM:	peso molecular
SAC:	sacarosa
SDS:	dodecil sulfato de sodio
TCA:	ácido tricloroacético
TEMED:	N, N, N',N' tetrametil-etilendiamina
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
UDP-glc:	Uridina 5' difosfato glucosa
UPTG:	UDP-glc: proteína transglucosilasa

<b>Introducción .....</b>	1
1 El tubérculo de papa .....	2
2 El proceso de tuberización .....	3
2.1 Factores que afectan la tuberización .....	4
3 El almidón .....	5
3.1 Enzimas de biosíntesis de almidón .....	5
3.1.1 Síntesis <i>de novo</i> de almidón .....	6
3.1.2 Fosforilasas .....	7
3.1.3 Almidón sintetasas .....	8
<b>Objetivo .....</b>	10
<b>Materiales y métodos .....</b>	12
1. Reactivos .....	13
2. Buffers .....	13
3. Material vegetal .....	13
3.1 Sistema de tuberización <i>in vitro</i> .....	14
4. Preparación enzimática .....	14
4.1 Medición de actividades enzimáticas .....	16
4.1.1 Ensayo de UDP-glc: proteína transglucosilasa (UPTG, enzima de la reacción 1) .....	16
4.1.2 Ensayo de las actividades de UDP(ADP)-glc almidón sintetasa (enzimas de la reacción 2) .....	16

4.1.3 Ensayo de fosforilasas .....	17
i)    Independiente de aceptor exógeno .....	17
ii)    Dependiente de aceptor exógeno .....	17
5. Almidón .....	18
5.1 Purificación .....	18
5.2 Determinación .....	18
6. Proteínas .....	18
7. Tratamiento con amiloglucosidasa .....	18
8. Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	19
8.1 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida .....	19
8.2 Inmunodetección (Western blot) .....	19
8.3 Fluorografía .....	20
9. Cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) en columna de intercambio aniónico (mono Q) .....	20
<b>Resultados .....</b>	<b>21</b>
1. Tuberización <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> .....	22
1.1 Efecto de sacarosa .....	25
1.1.1 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de microtubérculos en relación al proceso de tuberización .....	25
1.1.2 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de la tuberización sobre la acumulación de almidón en Microtubérculos .....	26
1.2 Efecto del ácido jasmónico .....	27
1.2.1 Acción del ácido jasmónico en el medio de inducción de microtubérculos en relación al proceso de tuberización .....	27

1.2.2 Efecto de JA en el medio de inducción de la tuberización sobre el número y peso fresco de los microtubérculos después de 35 días de cultivo .....	29
1.2.3 Efecto del ácido jasmónico en el medio de inducción de la Tuberización sobre la acumulación de almidón en microtubérculos de 21 ó 35 días de cultivo .....	29
1.3 Efecto de giberelinas .....	31
1.3.1 Acción de giberelinas en el medio de inducción de microtubérculos en relación al proceso de tuberización .....	31
2. Enzimas de síntesis de almidón durante el proceso de tuberización .....	32
2.1 Análisis de UDP-glc: proteína transglucosilasa (UPTG) durante la tuberización <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Spunta .....	34
2.1.1 Propiedades cinéticas de la UPTG en microtubérculo .....	34
2.1.2 Actividad de UPTG en microtubérculos inducidos en diferentes concentraciones de sacarosa .....	35
2.1.3 Actividad de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia de ácido jasmónico (Efecto de JA) .....	35
2.1.4 Fluorografía de productos radioactivos de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de ácido jasmónico .....	36
2.1.5 Inmunodetección (Western blot) de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de ácido jasmónico .....	37
2.1.6 Actividad de UPTG en estolones tuberizados (-GA <sub>3</sub> ) y no tuberizados (+GA <sub>3</sub> ) (Efecto de giberelina) .....	38
2.1.7 Fluorografía de los productos radioactivos de UPTG en estolones tuberizados (-GA <sub>3</sub> ) y no tuberizados (+GA <sub>3</sub> ) .....	39
2.1.8 Inmunodetección (Western blot) de UPTG en estolones tuberizados (-GA <sub>3</sub> ) o no tuberizados (+GA <sub>3</sub> ) .....	40
2.1.9 Actividad de UPTG en distintos órganos de la plántula de papa .....	41

2.1.10 Inmunodetección (Western blot) de UPTG en distintos órganos de la plántula de papa .....	41
2.2 Análisis de fosforilasas durante la tuberización <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Spunta .....	43
2.2.1 Propiedades cinéticas de fosforilasas en microtubérculos .....	43
2.2.2 Perfil de fosforilasas de microtubérculo luego de una cromatografía en columna de intercambio aniónico (mono Q) .....	44
2.2.3 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de fosforilasas (Efecto de sacarosa) .....	45
2.2.4 Acción del ácido jasmónico en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de fosforilasas (Efecto del ácido jasmónico) .....	46
2.2.5 Acción de giberelinas en el medio de inducción de la tuberización sobre la actividad de fosforilasas en estolones tuberizados (-GA <sub>3</sub> ) y no tuberizados (+GA <sub>3</sub> ) (Efecto de giberelina) .....	47
2.2.6 Inmunodetección (Western blot) de fosforilasas en estolones tuberizados (-GA <sub>3</sub> ) y no tuberizados (+GA <sub>3</sub> ) .....	48
2.2.7 Inmunodetección (Western blot) de fosforilasas en plántulas micropagadas .....	49
2.2.8 Inmunodetección (Western blot) de fosforilasas en hojas de planta de papa .....	50
2.3 Análisis de almidón sintetasas durante la tuberización <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Spunta .....	51
2.3.1 Análisis de almidón sintetasas en microtubérculos .....	
2.3.2 Inmunodetección (Western blot) del producto de UDP-glc: almidón sintetasa en microtubérculo .....	53
2.3.3 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de UDP-glc: almidón sintetasa .....	54

2.3.4 Acción del ácido jasmónico en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de almidón sintetasas (Efecto del ácido jasmónico) .....	55
2.3.5 Fluorografía de los productos radioactivos de la reacción en dos etapas, en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de ácido jasmónico .....	58
<b>Discusión .....</b>	<b>59</b>
1. Tuberización y acumulación de almidón .....	60
1.1 Efecto de sacarosa .....	60
1.2 Efecto del ácido jasmónico .....	60
2. Enzimas de síntesis de almidón .....	60
2.1 UPTG .....	60
2.2 Fosforilasas .....	61
2.3 Almidón sintetasas .....	62
<b>Referencias .....</b>	<b>65</b>

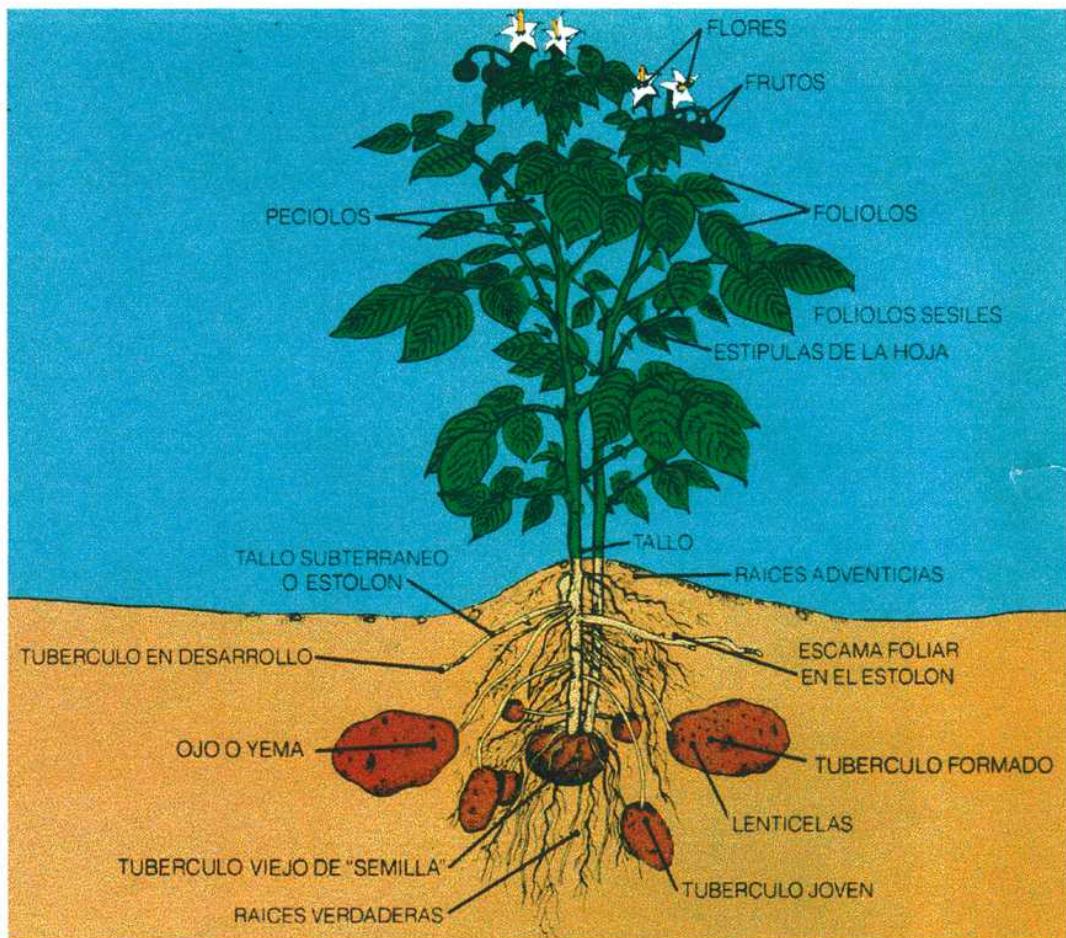
جَاهَهُ الْمُجَاهِدُونَ

## 1. El tubérculo de papa

La planta de papa, *Solanum tuberosum*, pertenece a la familia Solanaceae, que reúne especies variadas como tomate, tabaco, pimiento y berenjena. La porción comestible de la papa es el tubérculo, órgano donde se acumulan los productos de reserva, principalmente almidón; es por esto que el tubérculo se ha usado tradicionalmente como fuente de enzimas relacionadas con el metabolismo del polisacárido.

El tubérculo de papa es un tallo modificado que tiene hojas y yemas axilares muy reducidas, internudos acortados y un eje de tallo que se expande radialmente. El eje proviene de un estolón, tallo lateral que nace de los nudos basales de la planta de papa. El tubérculo se forma como consecuencia de la expansión radial de la región subapical del estolón.

Los tubérculos tienen yemas, que después de un período más o menos largo según las variedades, brotan para producir nuevas plantas.



**Figura 1:** esquema que muestra los distintos órganos de la planta de papa.

## **2. El proceso de Tuberización**

La tuberización comprende eventos tanto morfológicos como bioquímicos, que involucran la expresión diferencial de proteínas y una gran acumulación de almidón en las células del estolón que darán origen al tubérculo. El complejo proceso de tuberización está regulado por numerosos factores genéticos y ambientales tales como el fotoperíodo (los días cortos estimulan la tuberización, mientras que los días largos la inhiben), la temperatura, el contenido de nitrógeno, el dióxido de carbono del aire y diversas hormonas vegetales (Koda et al, 1988). Se sabe que diferentes efectores hormonales de la planta, controlan la tuberización y no se descarta que puedan actuar en forma concertada en la inducción de la misma. Se ha descripto que las giberelinas inhiben la tuberización en papa, mientras que las citoquininas la estimulan. Por otro lado el rol del ácido jasmónico, considerado ya como una hormona vegetal, es aún motivo de controversia.

No se sabe aun si el proceso de tuberización es un prerequisito para la acumulación de almidón o si la capacidad de la planta para sintetizarlo, determina la iniciación del tubérculo y su posterior desarrollo.

Se ha sugerido que la aparición de almidón o de alguno de sus precursores (sacarosa) podría ser una señal, de tipo metabólica, involucrada en la activación de genes tejido específicos (de tubérculo en este caso), (Willmitzer, 1989).

### **2.1 Factores que afectan la tuberización**

Muchos de los trabajos publicados en la inducción de tubérculos *in vitro* en plantas de papa, se ha focalizado en el uso de reguladores del crecimiento (hormonas), aunque otros pocos se realizaron en medios que no los contenían con el objeto de estudiar la respuesta fisiológica básica de las microplantas a estímulos ambientales en la producción de tubérculos (Garner y Blake, 1989). Aunque la concentración de sacarosa no puede considerarse directamente como un estímulo ambiental, ha sido encontrada en altos niveles en plantas de campo durante la tuberización.

En papa el uso de giberelinas ( $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$ ,  $GA_5$ ,  $GA_7$  y  $GA_9$ ) resultó inhibitorio para la tuberización (Tizio, 1971). En hojas de *Solanum tuberosum* ssp. *Andigena*, la cual necesita días cortos para tuberizar, se encontraron niveles bajos de actividad de giberelina después de transferir las plantas expuestas a fotoperíodos largos a condiciones de fotoperíodos cortos (Railton y Wareing, 1973). La relación entre el metabolismo de la giberelina y el fotoperíodo se conoce desde hace algún tiempo y se ha demostrado que el mismo afecta ciertos pasos en la biosíntesis de giberelinas biológicamente activas (Davies et al, 1986). En papa se ha encontrado un mutante de *S. Tuberosum* ssp *andigena* el cual tenía bloqueada la vía biosintética de giberelina entre  $GA_{12}$  y  $GA_{53}$ , dicho mutante podía tuberizar tanto en días cortos como en días largos (Van Den Berg et al, 1995).

Parece ser que el fitocromo B (phy B) afecta los niveles de giberelina o su actividad, pues algunos mutantes phy B han mostrado tener altos niveles de la hormona (Foster et al, 1994). Recientemente se ha demostrado en papa que la reducción en los niveles de phy B en un mutante portador de un RNA antisentido resultó en un alargamiento del tallo, reducción en los niveles de clorofila y pérdida del control fotoperiódico de la tuberización (Jackson et al, 1996). Se sugirió que todos estos fenotipos podrían ser el resultado de una alteración en el metabolismo de las giberelinas o de su sensibilidad, causados por una reducción en los niveles de phy B.

Por otro lado, experimentos realizados por Gregory (1956) y confirmados por Chapman (1958) muestran la primer evidencia de la existencia de una sustancia transmisible, inductora de la tuberización, que se produce en las hojas y es luego transportada a los estolones donde induce la iniciación de los tubérculos. Mucho trabajo se ha hecho en pro de identificar la naturaleza química de esta señal para la tuberización. Koda y Okazawa (1988) y Koda et al, (1988, 1991) han identificado y aislado de hojas una sustancia que tiene propiedades fuertemente inductoras de la tuberización *in vitro*. La estructura química de este compuesto está muy relacionada con la del ácido jasmónico (JA) y se lo llamó ácido tuberónico.

El JA tiene muchas propiedades que corresponden a una hormona vegetal y participa en gran variedad de respuestas en plantas, promueve la senescencia, inhibe el crecimiento en callos y la germinación en polen y semillas (review de Statswick, 1992). El JA también parece jugar un rol importante en respuesta a injurias físicas (Pena-Cortes et al; 1992). Al igual que el ácido tuberónico, JA tiene fuertes propiedades inductoras de la tuberización *in vitro* (Koda et al, 1991; Pelacho y Mingo-Castel, 1991; Abe et al, 1990; Matsuki et al, 1992).

Experimentos llevados a cabo *in vivo* en papas de la especie *Solanum andigena* y *Solanum demissum* que requieren días cortos para tuberizar, a las cuales se sometió a condiciones no inductoras (fotoperíodos largos o fotoperíodos cortos con irrupciones de 30 minutos de luz durante los períodos de oscuridad) al ser rociadas con JA en concentraciones mayores a 100  $\mu$ M no se indujo la tuberización (Jackson y Willmitzer, 1994). Este resultado se opone al papel de JA como señal en la inducción de la tuberización aunque no excluye un rol posterior en la formación y desarrollo del tubérculo una vez que la inducción ha tenido lugar. Por otro lado, Jackson y col. (1996) sugieren que la tuberización podría estar controlada por un balance de hormonas positivas y negativas, donde las giberelinas actuarían como efectores negativos.

### **3. El almidón**

El **almidón** es la principal fuente de reserva nutritiva y energética en las plantas superiores y se presenta en forma de gránulos insolubles en agua y prácticamente anhidros, lo que les permite acumularse en los órganos de reserva en cantidades considerables sin alterar su metabolismo. Están compuestos por dos polisacáridos: la **amilosa**, formada principalmente por cadenas lineales de residuos de D-glucosa en unión  $\alpha$ -(1,4) y la **amilopectina**, constituida por cadenas que tienen en promedio alrededor de 20-25 residuos de D-glucosa en unión  $\alpha$ -(1,4) con ramificaciones en uniones  $\alpha$ -(1,6) glucosídicas. El porcentaje de cada uno de sus componentes es característico de cada vegetal, junto con una pequeña proporción de sales, lípidos, nucleótidos y proteínas. Es muy probable que ambos polisacáridos estén asociados covalentemente a proteínas, con o sin actividad enzimática, en forma de proteoglicanos.

Los granos de almidón se pueden clasificar en dos grandes grupos: granos de almidón transitorios y granos de almidón de reserva. Los primeros se acumulan en los cloroplastos de hojas verdes durante la etapa lumínica de la fotosíntesis y son degradados durante la oscuridad para transformarse principalmente en sacarosa, la cual migra al resto del vegetal. El almidón de reserva se forma en los amiloplastos a partir de la sacarosa y se acumula en los órganos y tejidos apropiados para ser utilizado en las distintas fases del crecimiento. La estructura del almidón de reserva es típica de cada vegetal y permite muchas veces caracterizarlos, lo que lleva a suponer la intervención de un factor genético en su formación.

Varios son los problemas que se plantean para explicar la formación del grano de almidón, algunos de ellos se refieren al aislamiento y estudio de las varias enzimas que intervienen en su formación.

#### **3.1 Enzimas de biosíntesis de almidón**

La biosíntesis de almidón involucra varios procesos, la activación de unidades monoméricas de glucosa, su transferencia a aceptores apropiados y el modelado del producto en el proceso de polimerización (Pazur, 1965).

Las formas activadas de glucosa que pueden intervenir en la síntesis de almidón son glc-1-P, ADP-glc y UDP-glc. En los tejidos vegetales, la glc-1-P se forma como producto de la fotosíntesis, mientras que ADP-glc y UDP-glc se sintetizan a partir de la glc-1-P por acción de pirofosforilasas. La ADP-glc pirofosforilasa juega un rol clave en la biosíntesis del almidón ya que se encontró que en plantas transgénicas portadoras de un DNA antisentido de ADP-glc pirofosforilasa se inhibe casi totalmente la síntesis de almidón (Müller-Röber et al, 1992) y es sobre ella donde se ejerce el principal control regulatorio.

Otra enzima que interviene en la síntesis de almidón es la enzima ramificante. Esta enzima cataliza la formación de uniones  $\alpha$ -(1,6) en los puntos de ramificación de la amilopectina. La enzima ramificante utiliza como sustrato amilosas de 40 unidades de glucosa de longitud como mínimo (Borovosky y col., 1976). La formación del enlace  $\alpha$ -(1,6) ocurre por una transferencia intercatenaria.

### 3.1.1 Síntesis de novo de almidón

La naturaleza del aceptor para la biosíntesis de polisacáridos ha sido materia de controversia por mucho tiempo y es todavía tema de discusión. Se han descripto enzimas que pueden usar aceptores de naturaleza proteica o glucoproteica para la polimerización de unidades de glucosa activadas. Green y Stumpf (1942) e Illingworth y col. (1961) encontraron síntesis de glucanos, catalizadas por fosforilasas animales y vegetales, que eran independientes de aceptores polisacáridicos. Estos autores sugirieron que la enzima misma podría actuar como aceptor, formando una glucoproteína. Por otro lado Krisman (1972) describió la formación de un intermediario gluproteico en la iniciación de la síntesis del glucógeno en hígado de rata. Rivas y Pont lezica (1987), describieron una glucoproteína que podría actuar como aceptor en la síntesis de una cadena  $\beta$ -glucano, en el alga *Prototheca zopfii* que parece contener un 10% de azúcares y tendría un PM relativo de 28-30 KDa.

Lavintman y Cardini (1973) describieron una actividad enzimática capaz de transferir glucosa de UDP-glc a un aceptor proteico en fracciones particuladas de tubérculo de papa. Estas fracciones estaban constituidas principalmente por proplástidos carentes de almidón. Evidencias posteriores indicaron que en una primera etapa se formaba una glucoproteína y que esta glucoproteína serviría como aceptor de glucosa en una segunda etapa. La enzima que cataliza la formación de la glucoproteína durante la primera etapa se denominó UDP-glc: proteína transglucosilasa (PTG), tiene especificidad por el dador de glucosa UDP-glc y su actividad se puede detectar a concentraciones micromolares del nucleótido-azúcar (Lavintman y col., 1974). Tandecarz y Cardini (1978) postularon una vía de iniciación de la síntesis de almidón en dos pasos:

- 1- La transferencia de glucosa, específicamente a partir de UDP-glc (en concentraciones micromolares) a una proteína endógena. El producto de esta reacción es una glucoproteína con una única molécula de glucosa.
- 2- El alargamiento del aceptor glucoproteico, que involucra la interacción de la glucoproteína con ADP-glc, UDP-glc o glc-1-P, mediada por fosforilasas o almidón sintetasas. Se formarían así cadenas glucosídicas largas, unidas a la glucoproteína inicial. Estas cadenas se sintetizarían en presencia de concentraciones milimolares de los azúcares activados (Tandecarz y Cardini, 1978).

Las enzimas involucradas en los dos pasos de síntesis fueron solubilizadas (Moreno y Tandecarz, 1982) y posteriormente caracterizadas, como así

también los productos de ambas etapas (Moreno y col., 1986, 1987). El tratamiento del producto con un agente reductor mostró que se transfiere sólo una molécula de glucosa a partir de UDP-glc al residuo aminoacilo, formando una unión O-glucosídica. El aminoácido involucrado en la unión sería serina o treonina (Moreno y col., 1986). La glucoproteína formada en la reacción de UPTG pudo ser usada como aceptora por fosforilasas y almidón sintetasas parcialmente purificadas, en un sistema reconstituido a partir de la misma fracción particulada de tubérculo (Moreno y col., 1987). La UPTG es específica para la proteína endógena aceptora, ya que no puede transferir glucosa a un polisacárido exógeno agregado. Se ha sugerido que la misma enzima sea la proteína aceptora que se autoglucosila. Cuando se somete el producto de la reacción a electroforesis en condiciones desnaturizantes y posterior fluorografía, da una sola banda radioactiva con un peso molecular aparente de subunidad de 38 KDa, (Ardila y Tandecarz, 1992). Un sistema enzimático similar se describió en endosperma de maíz (Rothschild y Tandecarz, 1994).

### 3.1.2 Fosforilasas

Aunque la presencia de fosforilasa en plantas se conoce desde 1940, el rol fisiológico de esta enzima no está totalmente aclarado. La fosforilasa cataliza *in vitro* la siguiente reacción reversible:



La hipótesis más común es que el rol de la fosforilasa *in vivo* es degradativo. Esta hipótesis se basa en la proporción  $\text{P}_i/\text{glc-1-P}$  (3/300), que se encontró en algas y en tejido fotosintético de plantas superiores (Bassham y Krause, 1979; Heber y Santarius, 1965). Por otro lado, la concentración de glc-1-P hallada en plantas es muy baja, se calculó una concentración de 40  $\mu\text{M}$  en algas y 71,5-109  $\mu\text{M}$  en cloroplastos de espinaca (Preiss y Levi, 1980). Estas concentraciones están muy lejos de los  $K_m$  encontrados para la glc-1-P. Sin embargo, dada la compartimentalización celular, queda la posibilidad que en el sitio de localización de la fosforilasa haya una alta concentración de glc-1-P, comparada con el resto de la célula. Además se ha localizado a la enzima por métodos inmunológicos en las membranas de los amiloplastos (organelas donde se acumula el almidón) en los períodos de gran síntesis de almidón en tubérculos de papa. Dicho resultado apunta a un rol biosintético de la enzima (Shneider y col., 1981).

Investigaciones previas del laboratorio realizadas en tubérculo de papa y en callos desdiferenciados mostraron que existe una forma molecular de fosforilasa independiente de acceptor exógeno (FIA) quizás relacionada en la síntesis temprana del almidón. En callo desdiferenciado se observó que desaparece la FIA y paralelamente pierde su capacidad de sintetizar dicho polisacárido (Tandecarz, 1975; Moreno y Tandecarz, 1989; Catz y col., 1989).

Estos datos están a favor de un papel más bien sintético que degradativo de la fosforilasa. Otro trabajo que sustenta esta teoría es el realizado por Hawker, Marschner y Krauss (1979), en el cual describen una correlación positiva entre el aumento en la síntesis de almidón y una alta actividad de fosforilasa en tubérculos de papa en los primeros estadios de desarrollo que a su vez se correlaciona con una baja actividad de ADP-glc pirofosforilasa. También Müller-Röber y col. (1990) encontraron que en tubérculos muy jóvenes (menores de 1 g) no es posible detectar por Northern blot el mensajero de la ADP-glc pirofosforilasa.

Por otro lado Gerbrandy y Verleur (1971), sugirieron que ciertas isoenzimas de fosforilasa podrían estar involucradas en la biosíntesis de almidón en tubérculos jóvenes.

Hasta el día de hoy en plantas superiores se han descripto dos isoenzimas de fosforilasa denominadas tipo L y H localizadas en los amiloplastos y en el citoplasma, respectivamente (Shimomura et al, 1982; Moreno y Tandecarz, 1989; Mori et al, 1991). Una segunda isoenzima de tipo L ha sido recientemente clonada y se encontró que se acumula preferencialmente en hoja (cloroplastos) aunque su función aun no está aclarada (Sonnewald et al, 1995).

### 3.1.3 Almidón sintetasas

Las primeras enzimas descriptas en la polimerización de las unidades activadas de glucosa son aquellas que requieren un aceptor polisacárido o un fragmento de polisacárido. Se piensa que la formación de nuevas uniones glucano  $\alpha$ -(1,4) en el almidón ocurren predominantemente a través de la almidón sintetasa que fue descubierta por el grupo de Leloir en 1960. Posteriormente se la encontró en la mayoría de los tejidos vegetales fotosintéticos y no fotosintéticos. La almidón sintetasa cataliza la siguiente reacción:



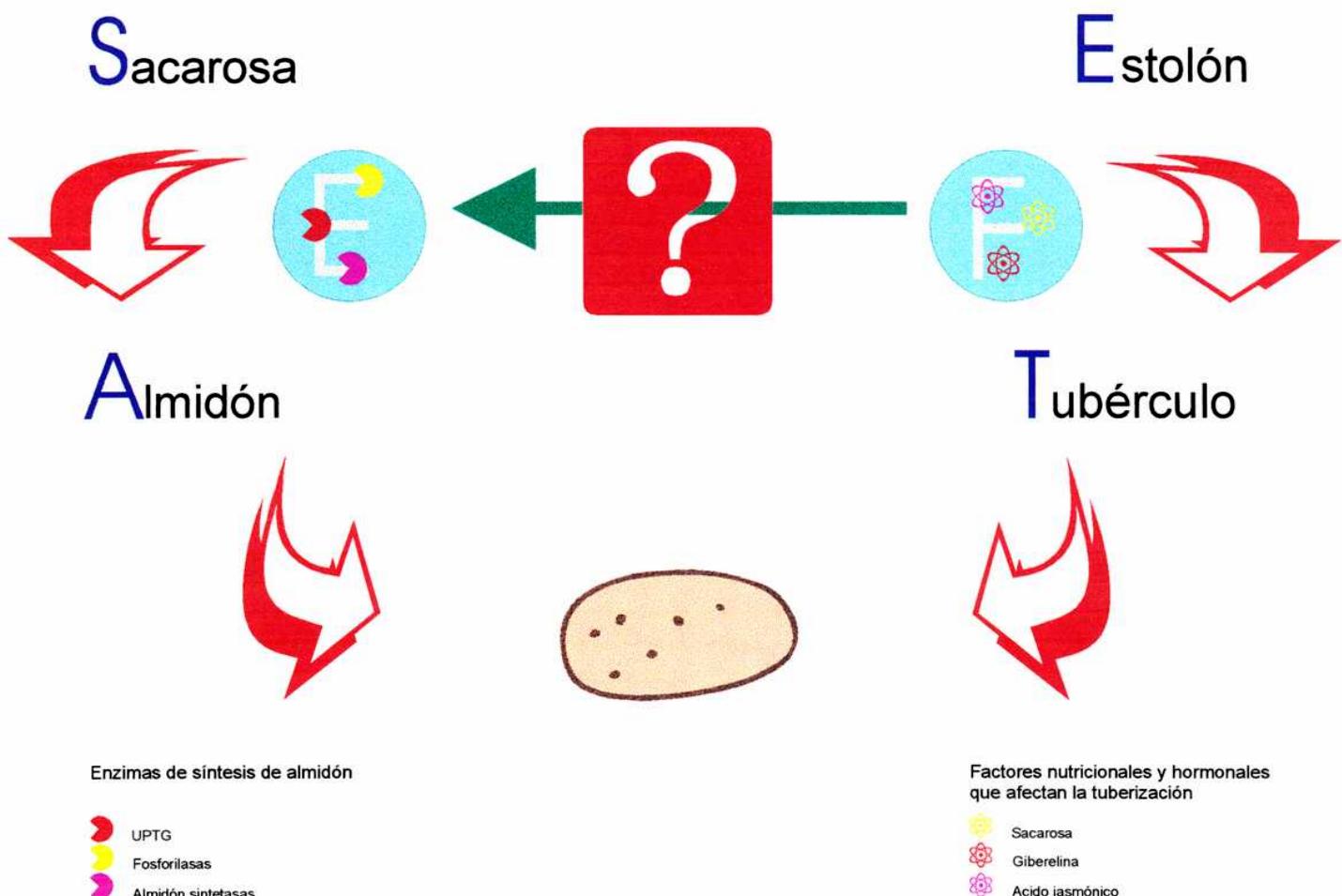
La enzima puede existir en forma soluble o particulada (parte principal de la actividad de almidón sintetasa está en forma particulada, estrechamente asociada al gránulo de almidón, Frydman y Cardini, 1967). La almidón sintetasa unida al grano de almidón puede usar UDP-glc o ADP-glc como dador de glucosa, pero la velocidad de transferencia es de 3 - 10 veces mayor cuando el dador es el ADP-glc (Recondo y Leloir, 1961). Por el contrario, la enzima soluble sólo es activa con ADP-glc (Cardini y Frydman, 1966).

Se sugirió que la almidón sintetasa puede cambiar sus propiedades con respecto al dador de glucosilo cuando está unida al gránulo de almidón. Frydman y Cardini (1967) mostraron que las enzimas particuladas pueden cambiar sus propiedades simplemente por disruptión mecánica.

Además de los nucleótido-azúcares, la almidón sintetasa requiere la presencia de un aceptor para su actividad. Este requerimiento puede ser satisfecho por amilosa, amilopectina, gránulos de almidón, oligosacáridos de la serie de maltodextrina y glucógeno (Cardini y Frydman, 1966).

# Objetivo

Los objetivos del trabajo son: estudiar el efecto de un factor nutricional como la sacarosa y de distintas hormonas vegetales (giberelina y ácido jasmónico) sobre la tuberización *in vitro* de papa y la síntesis de almidón. Se investigará principalmente la acción de dichos efectores sobre varias actividades enzimáticas involucradas en la síntesis del polisacárido (UPTG, fosforilasas y almidón sintetasas).



Therapeutic  
metabolism

## 1. Reactivos

[<sup>14</sup>C]glc-1-P (233,9 mCi/mmol) de Dupont®. El glucógeno de ostra, tipo II es de Sigma. Los standards de peso molecular, el Temed, los pre-stained, y el buffer MES son de Sigma. La acrilamida utilizada es de Merck. El persulfato de amonio, la N,N-metilen bisacrilamida, y el SDS son de Bio-Rad. El Coomasie Brilliant Blue G250, es de Fluka. Otras drogas y reactivos empleados se obtuvieron del mercado local.

## 2. Buffers

Buffer A: Tris-HCl 50 mM PH 7.4, 2-mercaptopetanol 20mM (buffer de extracción).

Buffer B: Tris-HCl 100 mM PH 7.4, 2-mercaptopetanol 20 mM.

Buffer C: Tris-HCl 100 mM PH 7.4, KCl 1M, 2-mercaptopetanol 20 mM.

Buffer D: Tris-HCl 62.5 mM, PH 6.8.

Buffer E: Tris-HCl 25 mM PH 8.3, glicina 200 mM y SDS 0.1%.

Buffer F: Tris 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%.

Buffer G: Tris-HCl 62.5 mM PH 6.8, SDS 3%, 2-mercaptopetanol 5%, glicerol 10% y BPB 0.25% (buffer de siembra).

Buffer H: Tris-HCl 62.5 mM PH 6.8, SDS 3%, 2-mercaptopetanol 5%, glicerol 10%, BPB 0.25% y urea 2M (buffer de siembra con urea)

Buffer I : ácido acético 0.2 M y acetato de sodio 0.2 M (buffer acetato)

TBS : Tris-HCl 50 mM PH 7.6, NaCl 150 mM,

Buffer J: Tris-HCl 25 mM PH 8.3, glicina 200 mM, SDS 0.1% y urea 2M.

## 3. Material vegetal

Plántulas de *Solanum Tuberosum* cv. Spunta, gentilmente cedidas por la Dra. F. Loschiavo (Universidad de Padova, Italia) se micropagaron por subcultivo de cortes uninodales en el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962). Se mantuvieron bajo fotoperíodo de 16:8 hs. (luz:oscuridad) con una intensidad de aproximadamente 60  $\mu\text{Em}^{-2}$ .

### 3.1 sistema de tuberización *in vitro*

El sistema de inducción de la tuberización *in vitro* consistió en la incubación de cortes nodales de plántulas micropropagadas en el medio MS (Bourque et al, 1987) con el agregado de la hormona a estudiar. En el caso de la giberelina, se agregó al medio a una concentración de  $10^{-5}$  M (Tizio, 1971). El ácido jasmónico se agregó hasta una concentración  $10^{-6}$  M (Koda, 1988).

El porcentaje de tuberización se calculó como el número de explantos tuberizados dividido el número de explantos totales por cien.

El número de microtubérculos por explanto se calculó como el número de microtubérculos totales dividido el número de explantos totales.

El peso fresco de los microtubérculos se calculó como el peso fresco de los microtubérculos totales dividido el número de microtubérculos.

La eficiencia de tuberización se calculó como el número de microtubérculos por explanto multiplicado por el peso fresco de los microtubérculos.

Se consideró como iniciación de la tuberización a la primer señal visible de aparición de microtubérculos por engrosamiento de las yemas inducidas.

Nota: Los experimentos se repitieron entre 3 y 5 veces y se presentaron los valores promedio de esos experimentos. El error en las mediciones fue de aproximadamente un 10%.

### 4. Preparación enzimática

La fuente de enzima se preparó por homogeneización del material (plántulas,estolones,hojas o microtubérculos) en mortero, según la metodología descripta por Tandecarz y col. (1978), agregando aproximadamente 3 veces su peso en volumen de buffer A. Se filtró la preparación con muselina y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 x g en rotor SS34 en centrifuga refrigerada Sorvall RC5C a 4 °C, el sobrenadante se centrifugó durante 20 minutos a 25000 x g a la misma temperatura. Este sobrenadante se centrifugó nuevamente a 140.000 x g durante 1:30 hs. a 4 °C en ultracentrífuga Beckman modelo L7-65 en rotor R-65. Tanto el sobrenadante de esta ultracentrifugación (S140) como el pellet (P140) fueron utilizados como fuentes de enzima.

### Esquema de extracción enzimática

Material vegetal + buffer A

Homogenato

$3\ 000 \times g$ , 10 min.

Almidón

Sobrenadante

$25\ 000 \times g$ , 15 min.

Precipitado

Sobrenadante

$140\ 000 \times g$ , 90 min.

Precipitado  
( $P_{140}$ )

Sobrenadante  
( $S_{140}$ )

#### **4.1 Medición de actividades enzimáticas**

(Salvo que se indique lo contrario, todas las actividades enzimáticas se midieron en microtubérculos de 35 días de cultivo).

##### **4.1.1 Ensayo de UDP-Glc: proteína transglucosilasa (UPTG, enzima de la reacción 1)**

Alícuotas de la fracción enzimática (P140), entre 10-50 µg de proteína, se incubaron con una mezcla de reacción que contenía Cl<sub>2</sub>Mn 10 mM, y 2 µl de UDP(<sup>14</sup>C)Glc (130.000 cpm que equivalen a 190 pmoles de glc) en buffer A (volumen final 50 µl). a 30°C durante 10 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA 10 % frío y se dejó en hielo durante 20 minutos para favorecer la precipitación. Se filtraron las muestras a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore H.A.), se secó en lámpara de infrarrojo y se midió radioactividad en un contador de centelleo líquido marca Beckman modelo LS 8100, con líquido de centelleo (Tolueno Omnidifluor)

##### **4.1.2 Ensayo de las actividades de UDP (ADP)-Glc almidón sintetasa (enzimas de la reacción 2)**

La actividad se midió en dos etapas. En la primer etapa se incubaron alícuotas de la fracción enzimática P140 (50 µg de proteínas), en la mezcla de reacción descripta para el ensayo de UPTG. Se incubó a 30°C durante 10 minutos. En la segunda etapa, se agregó a la mezcla de reacción UDP-Glc o ADP-Glc (1mM) y se continuó la incubación a la misma temperatura durante 90 minutos. La reacción se frenó con el agregado de 1 ml de TCA frío. Se dejó en hielo durante 20 minutos para favorecer la precipitación.

La actividad se midió como radioactividad incorporada al precipitado de TCA, para lo cual se filtraron las muestras a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore H.A.), se las secó bajo lámpara de infrarrojo y se contó en contador de centelleo líquido marca Beckman modelo LS 8100, con líquido de centelleo (Tolueno Omnidifluor).

#### 4.1.3 Ensayo de fosforilasas

##### i) Independiente de aceptor exógeno:

Alícuotas de la fracción enzimática (S140), aproximadamente 50 µg de proteína, se incubaron con una mezcla de reacción que contenía: BSA 5mg/ml,

Glc-1-P 50 mM, buffer MES 125mM PH 5,65 y 2 µl de [<sup>14</sup>C] glc-1-P (97000 cpm que equivale a 186 pmoles de glc) en buffer A a 30 °C durante 90 minutos.

La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA 10% frío y se dejó en hielo durante 20 minutos para favorecer la precipitación.

Esta actividad también se determinó cualitativamente, a través del siguiente método colorimétrico: se incubaron alícuotas de la misma fracción enzimática en la misma mezcla de reacción descripta anteriormente (pero sin glucosa radioactiva) a la misma temperatura antes mencionada. Luego del período indicado de incubación se trajeron alícuotas y se agregó una gota de una solución de I<sub>2</sub>-Ik en buffer acetato 0.1M PH 4.8. La aparición de color azul, característico del complejo formado por el virtual polisacárido alargado y el iodo, es indicativo de esta actividad.

##### ii) Dependiente de aceptor exógeno:

Alícuotas de la fracción enzimática (S140), aproximadamente 50µg, se incubaron con una mezcla de reacción que contenía: glucógeno de ostra 6 mg/ml y 2 µl de [<sup>14</sup>C]glc-1-P (97000 cpm que equivale a 186 pmoles de glc) en buffer A a 30 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de KCl 1% en metanol 70% y se dejó en hielo durante 20 minutos para favorecer la precipitación del polisacárido. Se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm en centrífuga analítica marca Rolco. El precipitado se resuspendió en agua y se lavó 3 veces con el fin de eliminar la radioactividad no incorporada al glucógeno. Finalmente se agregó el líquido de centelleo, Tolueno Tritón [25% de tritón x 100 (v/v) en una solución de 4 g/l de Omnidifluor en Tolueno] y se contó en contador de centelleo líquido Beckman modelo LS8100.

## **5. Almidón**

### **5.1 Purificación**

Se homogeneizó el material vegetal en mortero con buffer A, se filtró el material con muselina y se centrifugó durante 10 minutos a 3 000 x g. El pellet de dicha centrifugación, se lavó dos veces con agua, tres veces con etanol, tres veces con butanol, una vez con acetona y finalmente una vez con éter sulfúrico.

### **5.2 Determinación**

El almidón purificado se suspendió en agua hasta una concentración de 1mg/ml y se calentó a 100°C durante 15 minutos con agitación. Se tomaron muestras entre 20 y 40 µl de esta solución y se llevaron a 500µl finales con agua. Se agregaron 20 µl de fenol y se agitó inmediatamente. Luego se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agitó y se calentó a 100°C durante 10 minutos. Finalmente se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro Gilford Response™.

## **6. Proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry et al.(1951) usando seroalbúmina bovina como standard. La absorbancia se midió a 700 nm en un espectrofotómetro Gilford Response™.

## **7. Tratamiento con amiloglucosidasa**

Luego de la reacción en dos etapas descripta para almidón sintetasas, la reacción se paró con 1 ml de TCA 10% frío, se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm en centrífuga analítica marca Rolco y se resuspendió el pellet en 200 µl de agua. Para lavar el TCA, se agregó 1 ml de éter, se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas y se descartó la fase etérea (el lavado se repitió 3 veces).

El precipitado se resuspendió en 70 µl de buffer acetato 0,1 M PH 4,8 al cual se le agregó una punta de espátula de amiloglucosidasa marca y se incubó

durante tres horas a 45° bajo vapores de tolueno. La reacción se paró con el agregado de 1ml de TCA 10% frío.

## **8. Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en minigel armado en una celda BIO-RAD (Mini Protean II) según lo descripto por Laemmli (1970) y algunas consideraciones de Fairbancks y col. (1971). El gel concentrador tenía un 4% de acrilamida y el gel separador un 10%, las dimensiones del gel fueron las siguientes: 7 cm de alto, 8 cm de ancho, y 0,75 mm de espesor. Las muestras se prepararon del siguiente modo: las proteínas se precipitaron con TCA 10%, los precipitados se solubilizaron en una mezcla desnaturizante (buffer G). Luego se calentaron a 100 °C durante 2 minutos y se sembraron en el gel. La electroforesis se desarrolló a 180 mv durante 45 minutos en buffer E.

### **8.1 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.**

Los geles se fijaron y se tiñeron en una solución acuosa de Coomasie Blue G250 0,25% en una solución de metanol: ácido acético: agua (5: 5: 1), durante 20 minutos.

Luego se decoloraron en una solución acuosa de ácido acético 7% y metanol 5%. Ambos procesos se realizaron en agitación y a temperatura ambiente.

### **8.2 Inmunodetección (Western Blot).**

Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa (BA85) según la técnica de Towbin y col.(1979) en una celda de transferencia electroforética BIO-RAD (Mini Trans-Blot) en buffer F. La transferencia se llevó a cabo en cuarto frío a 80 mv durante 2:30 hs.

Los sitios inespecíficos se bloquearon con una solución de TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, PH 7,5) que contenía 3% de leche durante, 30 minutos. La membrana de nitrocelulosa se incubó primero con un anticuerpo hecho en conejo (anti- fosforilasa o anti UPTG de tubérculo de papa), diluido 1: 500 en TBS-leche. El segundo anticuerpo utilizado fue una Ig G de cabra anti Ig G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1: 500 en TBS-leche. Las membranas se revelaron con una mezcla que contenía 20 µl de una solución de NBT (10 mg de NBT disueltos en 140 µl de DMF + 60 µl de agua), 10 µl de

una solución de Bcip (25 mg de Bcip disueltos en 1 ml de DMF), 1 ml de buffer Tris-HCl 1M PH:9.2, 200  $\mu$ l de NaCl 5M, 2.5  $\mu$ l de MgCl 2M, en un volumen final de 10 ml, según las indicaciones del catálogo. La reacción se paró con el agregado de agua destilada.

### **8.3 Fluorografía**

Los productos radioactivos de la mezcla de incubación para UPTG (item 4.1.1) o para almidón sintetasas (item 4.1.2) se precipitaron en TCA, se centrifugaron y se solubilizaron en buffer de siembra (buffer H) para su posterior electroforesis en geles con SDS y urea 2M. El buffer utilizado en la corrida electroforética fue el buffer J.

Luego de la corrida, se tiñeron los geles con Coomasie Blue G 250 y se secaron. Los geles secos conteniendo el material radioactivo, fueron expuestos a películas Kodak X-OMAT AR-5 a -70°C durante 10-30 días.

### **9. Cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) en columna de intercambio aniónico (mono Q)**

El S140 (aproximadamente 9 mg de proteína) fue cromatografiado en columna mono-Q® HR 5/5 de 0,5 cm de diámetro por 5 cm de alto, en aparato de FPLC (Pharmacia) equilibrada con buffer B. La columna fue previamente lavada con 10 ml del buffer y luego eluida con 16 ml de un gradiente lineal de KCl (0-0.5M) en el mismo buffer a 0.7 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Regression

# **1. Tuberización *in vitro* de *Solanum tuberosum* cv. Spunta**

Como se mencionó en la introducción, el objetivo del presente trabajo es relacionar el proceso de tuberización con la síntesis de almidón. Para ello se decidió estudiar el efecto de ciertos factores nutricionales (sacarosa) y hormonales (giberelina y ácido jasmónico) tanto sobre la tuberización como sobre enzimas relacionadas con la biosíntesis de almidón.

Para cumplir con los objetivos fijados, se eligió un sistema de tuberización *in vitro* porque nos permite visualizar los tubérculos y caracterizar fisiológicamente y morfológicamente el proceso de tuberización, más fácilmente que un sistema *in vivo*. En segundo lugar, nos facilita analizar el efecto tanto de las hormonas como de la sacarosa sobre la acumulación de almidón que ocurre durante la tuberización. También es posible controlar con mayor facilidad otros factores que podrían afectar ambos procesos tales como el fotoperíodo, la temperatura, el contenido de nitrógeno y dióxido de carbono del aire, nutrientes, etc. y así estar seguros de que las variaciones observadas se deban exclusivamente al efecto testeado en cada caso.

En la figura 2 se pueden ver las plántulas de papa micropropagadas (Fig. 2 A), que son fuente de los cortes uninodales de tallos que se cultivan en el medio de inducción de la tuberización (Fig. 2 B) para la obtención del sistema de tuberización *in vitro* (como se describe en "materiales y métodos"). A partir de las yemas de los tallos se observa la diferenciación de pequeños tubérculos (microtubérculos) o de tallos etiolados denominados estolones, por homología con los tallos subterráneos que dan origen a los tubérculos.

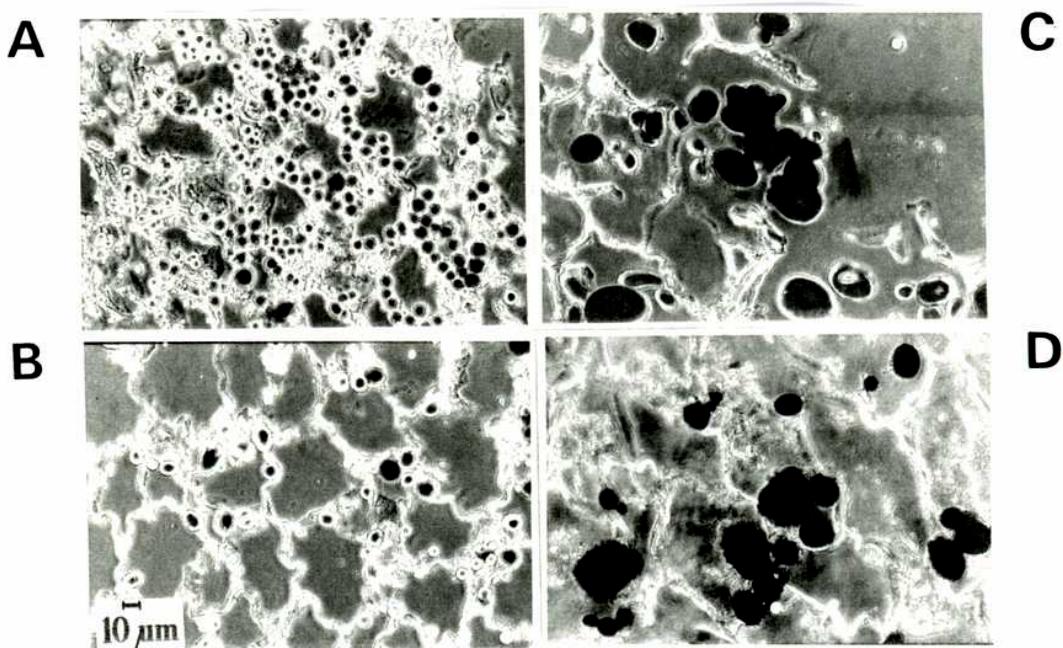


**Figura 2:** Sistema de tuberización *in vitro*. A: planta micropropagada. B: Inducción de microtubérculos.

Se realizaron secciones de tejido con el objeto de comparar los tamaños celulares y los gránulos de almidón de microtubérculos inducidos *in vitro* y de tubérculos maduros crecidos en tierra (*in vivo*). Se observó que los microtubérculos aunque presentan un tamaño de células de menor dimensión que las de tubérculos maduros, sus gránulos de almidón tienen el mismo aspecto y tamaño (Fig. 3, tabla 1).

**Tabla 1: Comparación de los tamaños celulares y gránulos de almidón de microtubérculos y tubérculos maduros.**

Tejido	Células ( $\mu\text{m}$ )	Gránulo de almidón ( $\mu\text{m}$ )
<b>Microtubérculo</b>		
Parénquima cortical	55	6-10
Parénquima medular	50-70	15-31
<b>Tubérculo maduro</b>		
Parénquima medular	80-110	15-35

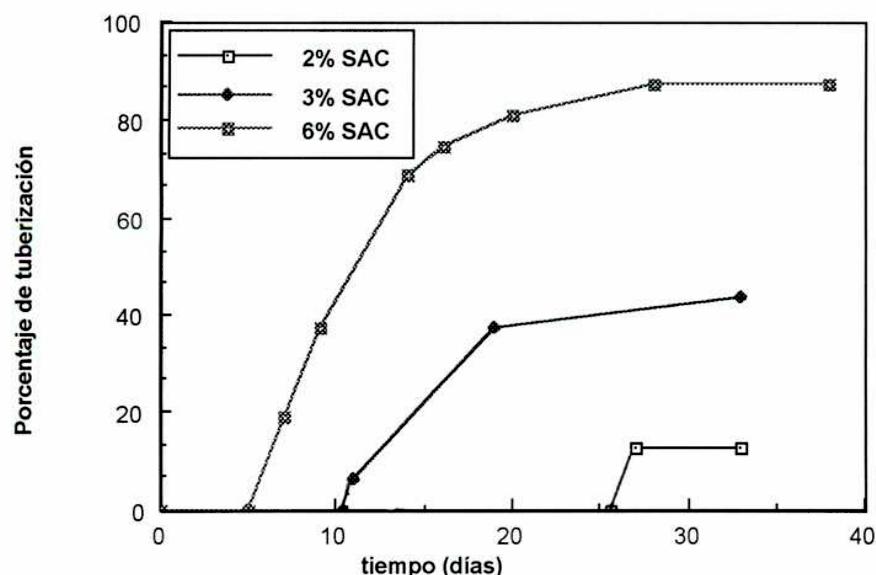


**Figura 3:** Microscopía óptica de fase, de secciones de parénquima cortical (A y B) y de parénquima medular de microtubérculos (C) o de tubérculos maduros (D). Se visualiza el almidón con el reactivo de yodo.

## 1.1 Efecto de sacarosa

### 1.1.1 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de microtubérculos en relación al proceso de tuberización.

Con el objeto de analizar la relación entre el proceso de tuberización y la concentración de sacarosa en el medio de inducción, se midió el porcentaje de tuberización en función del tiempo de cultivo a 2%, 3% y 6% de sacarosa. Se observó una correlación positiva entre la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y el adelantamiento en la iniciación de la tuberización. Además se encontró un aumento en el porcentaje de tuberización al tiempo de la cosecha (35 días) en función de la concentración de sacarosa (fig. 4). A concentraciones de sacarosa del 2% los microtubérculos aparecen a los 27 días de cultivo y no alcanzan el 50% de tuberización hasta el fin del experimento (35 días). A 3% de sacarosa, los explantos tuberizan a los 11 días de cultivo y el 50% de tuberización lo alcanzan a los 35. Finalmente los explantos cultivados con un 6% de sacarosa, tuberizan a los 7 días de cultivo y el 50% de tuberización lo alcanzan a los 10-11 días de cultivo, aproximadamente. (Fig. 4, tabla 2)



**Figura 4:** Efecto de la sacarosa sobre el porcentaje de tuberización en función del tiempo de cultivo. El porcentaje de tuberización en función del tiempo de inducción de los microtubérculos cultivados en 2, 3, y 6% de sacarosa, se determinó como se indica en materiales y métodos.

**Tabla 2: Efecto de la concentración de sacarosa sobre la iniciación de la tuberización**

Sacarosa (%)	Iniciación de la tuberización (días)	Tuberización a los 35 días de cultivo (%)
2	27	15
3	11	42
6	7	90

Cuando analizamos los microtubérculos cultivados luego de 35 días a distintas concentraciones de sacarosa, observamos un aumento en el tamaño de los mismos en función del azúcar en el medio de cultivo y un incremento en el número de microtubérculos por explanto.

**Tabla 3: Efecto de la concentración de sacarosa sobre el número y peso fresco de microtubérculos al tiempo de cosecha (35 días).**

Sacarosa (%)	Microtubérculos/ Explanto	Peso fresco de los microtubérculos (mg)
2	0,5	69
3	0,75	152
6	1,4	236

#### 1.1.2 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de la tuberización sobre la acumulación de almidón en microtubérculos

Como la sacarosa es el azúcar precursor del almidón, sería lógico pensar que un aumento de su concentración en el medio de cultivo se vería reflejada en una mayor acumulación del polisacárido en los microtubérculos. Para verificar dicha hipótesis, se midió el almidón en microtubérculos crecidos en 3% y 6% de sacarosa (Tabla 4).

**Tabla 4: Efecto de sacarosa sobre la acumulación de almidón en microtubérculos.**

Sacarosa (%)	Almidón (mg glc . g <sup>-1</sup> de peso fresco)
3	16,6
6	26,9

Nota: 2,1 g de microtubérculos crecidos en 3% de sacarosa ó 2,8 g de microtubérculos crecidos en 6% de sacarosa en el medio de inducción, se homogeneizaron y se determinó el almidón como se indica en "materiales y métodos".

La concentración de almidón resultó ser un 62% mayor en aquellos microtubérculos que fueron cultivados en 6% de sacarosa con respecto a aquellos cultivados en una concentración del 3%.

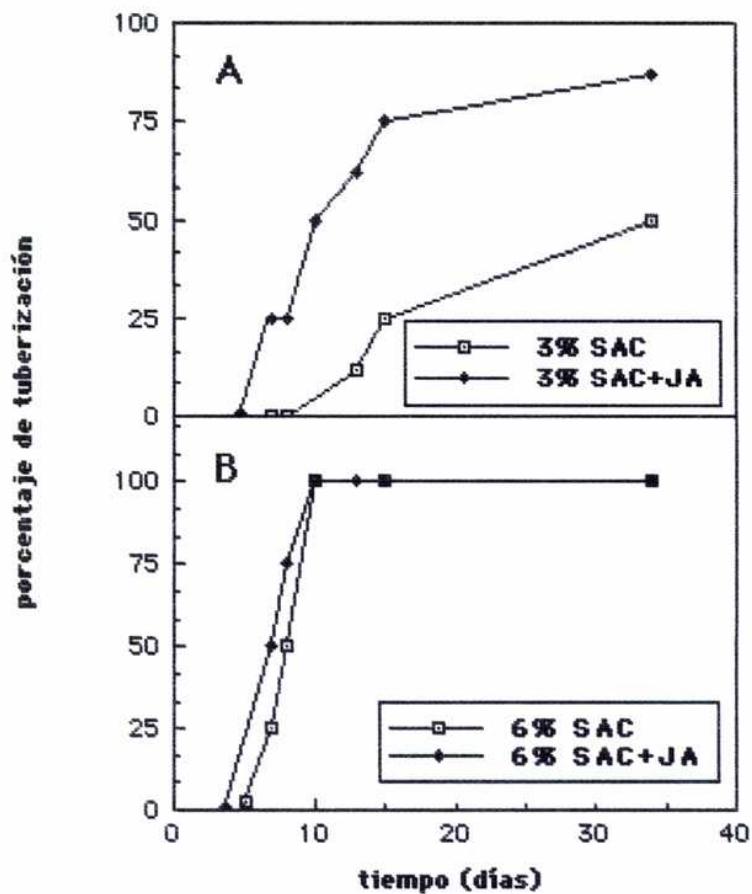
## 1.2 Efecto del ácido jasmónico

### 1.2.1 Acción del ácido jasmónico en el medio de inducción de microtubérculos en relación al proceso de tuberización

Con el objeto de estudiar el efecto de JA sobre la tuberización *in vitro* de papa, se midió el porcentaje de tuberización en función del tiempo de cultivo en medios de inducción de microtubérculos con baja y alta concentración de sacarosa (Fig. 5).

A 3% de sacarosa se observó en presencia de JA un adelanto notorio de la tuberización de los explantos y el 50% de tuberización se alcanzó a los 10 días aproximadamente. En su ausencia se retrasa la tuberización y el 50 % se alcanza a los 35 días de cultivo (Fig. 5 A).

A 6% de sacarosa, tanto en presencia como en ausencia de la hormona (Fig.5 B), los explantos tuberizan prácticamente al mismo tiempo, habiendo una diferencia de 1 día entre los primeros y los segundos para alcanzar un porcentaje de tuberización del 50% (7 y 8 días respectivamente)



**Figura 5: efecto de JA en el medio de inducción de la tuberización a baja (A) y alta (B) concentración de sacarosa**

**1.2.2 Efecto de JA en el medio de inducción de la tuberización sobre el número y peso fresco de los microtubérculos después de 35 días de cultivo.**

Cuando se estudió el efecto de JA en el medio de inducción de la tuberización, se encontró que a 3% de sacarosa la hormona duplica el número de microtubérculos por explanto pero no produce variaciones en el peso fresco de los mismos. A 6 % de sacarosa en cambio, no se observa efecto de JA en el número de los microtubérculos pero sí se observa un aumento del 33% en el peso fresco (Tabla 5). Por otro lado, si definimos como “eficiencia de tuberización” al producto entre “microtubérculos/explanto” y “peso fresco de los microtubérculos” encontramos que a 3% de sacarosa en presencia de JA, se ve aumentada en un 87%, mientras que a 6% de sacarosa el aumento en la eficiencia de tuberización es del 32% en presencia de la hormona.

El fenotipo de los microtubérculos inducidos en presencia de JA son indistinguibles de los inducidos en su ausencia (misma forma y color).

**Tabla 5: Efecto de JA en el medio de inducción de la tuberización, sobre el número y peso fresco de los microtubérculos después de 35 días de cultivo.**

Sacarosa (%)	Ac. Jasmónico ( $10^{-6}$ M)	Microtub./Explanto	Peso fresco de los microtub. (mg)	Eficiencia de tuberizac. (microtub . explanto <sup>-1</sup> . peso fresco)
3	-	0,75	152	114
3	+	1,43	150	214
6	-	1,4	236	330
6	+	1,4	313	438

**1.2.3 Efecto del ácido jasmónico en el medio de inducción de la tuberización sobre la acumulación de almidón en microtubérculos de 21 ó 35 días de cultivo.**

Se mostró anteriormente que el JA estimula la tuberización, por ello quisimos analizar si esta hormona tenía algún efecto sobre la acumulación de almidón ya que el objetivo de este trabajo es precisamente estudiar la relación entre dicho proceso y las enzimas de síntesis del polisacárido. Se midió la acumulación de almidón en microtubérculos crecidos tanto en 3% como en 6% de sacarosa. En los microtubérculos crecidos a baja concentración de

sacarosa el almidón se midió luego de 21 ó 35 días de cultivo mientras que a alta sacarosa, sólo se midió luego de 35 días de cultivo (Tabla 6).

No se observaron diferencias en la acumulación de almidón como respuesta a la presencia de JA en el medio de inducción de la tuberización en los microtubérculos cultivados en 3% ó 6% de sacarosa luego de 35 días de cultivo, sin embargo se encontró un aumento de 2,7 veces en la concentración de almidón en los microtubérculos cultivados durante 21 días en 3% de sacarosa en presencia de JA.

**Tabla 6: Efecto de JA sobre la acumulación de almidón en microtubérculos inducidos en medios de cultivo que contienen 3% ó 6% de sacarosa luego de 21 ó 35 días de cultivo.**

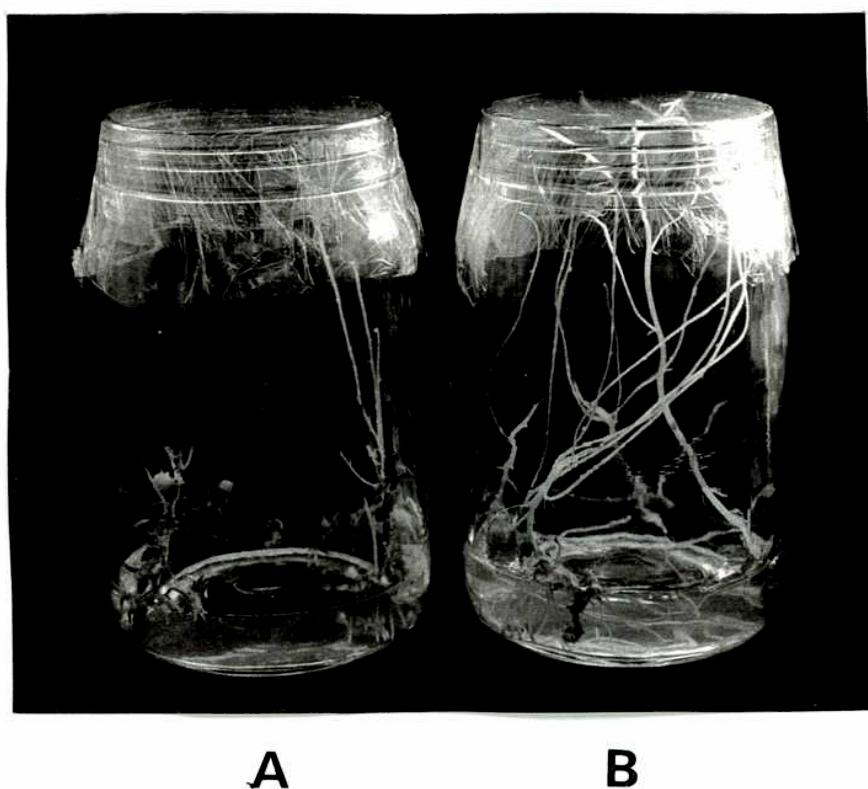
Sacarosa (%)	Acido jasmónico ( $10^{-6}$ M)	Peso fresco (g)	Almidón a los 21 días de cultivo (mg glc . g <sup>-1</sup> de peso fresco)	Almidón a los 35 días de cultivo (mg glc . g <sup>-1</sup> de peso fresco)
3	-	2,105	3	16,6
3	+	1,400	8,23	18,9
6	-	2,798	nd	26,9
6	+	3,094	nd	31,8

Nota: nd= no se determinó

## 1.3 Efecto de giberelinas

### 1.3.1 Acción de giberelinas en el medio de inducción de microtubérculos en relación al proceso de tuberización

Como estaba descripto para otras variedades de papa (Tizio, 1971), en presencia de giberelinas ( $10^{-5}$  M) en el medio de inducción de la tuberización no se observó aparición de microtubérculos y sólo se observaron abundantes estolones largos y delgados. (fig. 6 B). Por otro lado en ausencia de giberelina se observó la aparición de microtubérculos sobre los estolones y sobre los cortes de tallos originales. (Fig. 6 A).



**Figura 6:** sistema de tuberización *in vitro* en ausencia de giberelina (A) o en presencia de giberelina (B).  
Cortes uninodales de plántulas micropropagadas se incubaron durante 35 días en medios de inducción de la tuberización en presencia de 6% de sacarosa en ausencia (A) o en presencia de  $10^{-5}$  M de giberelina (B).

## **2. Enzimas de síntesis de almidón durante el proceso de tuberización**

La tuberización comprende eventos tanto morfológicos como bioquímicos, que determinan la expresión diferencial de proteínas y una gran acumulación de almidón en las células del estolón que darán origen al tubérculo.

En el laboratorio se sostiene que la síntesis de novo del almidón involucra dos etapas, en la primera de ellas la UDP-Glc: proteína transglucosilasa (UPTG) cataliza su propia glucosilación utilizando como dador de glucosas al nucleótido azúcar UDP-Glc. Así, la proteína glucosilada, producto de la primer etapa, es sustrato de sintetasas y fosforilasas, que elongarán la cadena glucosídica (ver introducción).

Para analizar la relación existente entre tuberización y síntesis de almidón, en el presente trabajo estudiaremos si algunos factores hormonales y nutricionales (sacarosa, Ácido Jasmónico y Giberelinas) que afectan la tuberización, también afectan a enzimas involucradas en la síntesis del polisacárido (UPTG, fosforilasas y sintetasas).

## 2.1 Análisis de UDP-glc: proteína transglicosilasa (UPTG) durante la tuberización *in vitro* de *Solanum tuberosum* cv Spunta.

### 2.1.1 Propiedades cinéticas de la UPTG en microtubérculo.

Todos los estudios previos sobre la enzima UPTG descriptos en la introducción, se llevaron a cabo en tubérculos maduros de papa cultivada en tierra. Para poder cotejar los resultados actuales obtenidos en un sistema de tuberización *in vitro* con los de trabajos anteriores, se comparó entonces el comportamiento cinético de la UPTG extraída de microtubérculos (*in vitro*) con el de la misma enzima extraída de papa cultivada en tierra (*in vivo*). Para ello se midió la formación de producto (como se detalla en "materiales y métodos") en función del tiempo, tanto en papa como en microtubérculo (Fig. 7)

Se observó una reacción muy rápida de incorporación de glucosas radioactivas al precipitado de TCA en la enzima obtenida tanto *in vitro* como *in vivo* (el plateau de incorporación se alcanza a los 7-10 minutos) aunque se encontró una velocidad inicial mayor en el caso de microtubérculos.

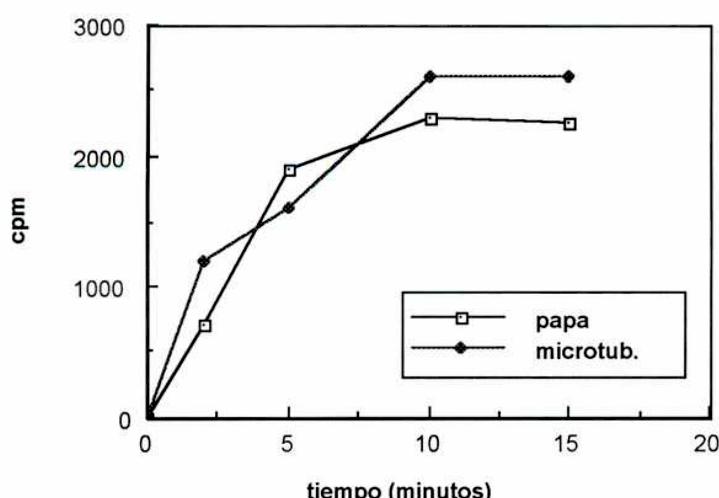


Figura 7: Curva de tiempo de la UPTG de papa y microtubérculo

2.1.2 Actividad de UPTG en microtubérculos inducidos en diferentes concentraciones de sacarosa (Efecto de sacarosa).

Como la UPTG es la primer enzima en la síntesis *de novo* del almidón, resultó de gran interés estudiar el nivel de actividad de dicha enzima en microtubérculos inducidos a baja concentración (3%) ó a alta concentración (6%) de sacarosa (Tabla 7) ya que en el ítem 1.1 se había observado un efecto de sacarosa en la acumulación del polisacárido.

**Tabla 7: Actividad específica de UPTG en microtubérculos inducidos en medios que contienen 3% ó 6% de sacarosa.**

Sacarosa (%)	Act. Específica de UPTG (pmoles glc . min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteína)
3	42
6	25

**Nota: La medición de la actividad se realizó como se indica en “materiales y métodos”.**

La actividad específica de UPTG disminuye un 60% cuando los microtubérculos son inducidos en medios con una concentración de sacarosa del 6% con respecto a aquellos inducidos en 3% de sacarosa.

2.1.3 Actividad de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia de ácido jasmónico (Efecto de ácido jasmónico).

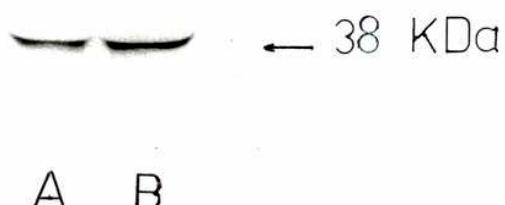
En el ítem 1.2 de “resultados” se mostró que el JA producía un efecto estimulador en la tuberización sólo en plántulas inducidas en un 3% de sacarosa mientras que a 6% no se veía efecto. Entonces, decidimos estudiar si hay también algún efecto de JA sobre la actividad de UPTG. Para ello medimos UPTG en microtubérculos crecidos en 3% ó en 6% de sacarosa en presencia o en ausencia de JA en el medio de inducción (Tabla 8). Se observa que tanto a 3% como a 6% de sacarosa, el ácido jasmónico duplica la actividad de UPTG.

**Tabla 8:** Efecto de JA sobre la actividad de UPTG en microtubérculos crecidos en 3% ó 6% de sacarosa en el medio de inducción

Sacarosa (%)	Acido Jasmónico ( $10^{-6}$ M)	Act. específica de UPTG (pmoles de glc . min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteínas)
3	-	42
3	+	80
6	-	25
6	+	40

2.1.4 Fluorografía de productos radioactivos de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de ácido jasmónico

En la introducción mencionamos que la UPTG es la proteína aceptora que se autoglucosila y que presenta un tamaño de subunidad de 38 KDa. Para analizar entonces si el aumento en la actividad específica de la UPTG producido por JA, estaba realmente correlacionado con un aumento en la incorporación de glucosas a la proteína de 38 KDa, se realizó una fluorografía de los productos radioactivos de UPTG en microtubérculos inducidos en medios con un 3% de sacarosa, en presencia o en ausencia de JA (Fig. 8). Se observó una sola banda radioactiva de 38KDa que corresponde al producto de UPTG que es más intensa en presencia de la hormona (canal B) que en su ausencia (canal A).

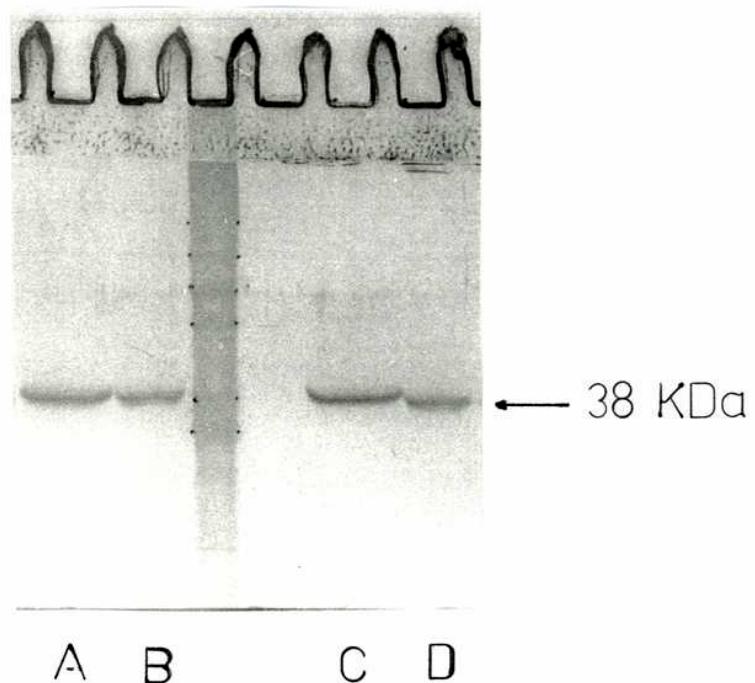


**Figura 8:** Fluorografía de los productos radioactivos de UPTG en microtubérculos cultivados en 3% de sacarosa, inducidos en presencia (canal B) o en ausencia (canal A) de JA en el medio de cultivo.

### 2.1.5 Inmunodetección (Western blot) de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de ácido jasmónico.

Como se encontró una mayor cantidad de producto de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia de JA, estudiamos si dicho efecto estaba relacionado con una inducción en la síntesis de la proteína por la hormona. Para ello decidimos hacer una inmunodetección de UPTG en microtubérculos inducidos con y sin JA (Fig. 9).

No se detectó diferencia alguna en la intensidad de la banda de 38 KDa reconocida por el anticuerpo anti-UPTG en ningún caso.



**Figura 9:** Inmunodetección de UPTG en microtubérculos inducidos en concentraciones de 3% (cañales A y B) ó 6% (cañales C y D) de sacarosa, en presencia (cañales B y D) o en ausencia (cañales A y C) de JA en el medio de cultivo.

## 2.1.6 Actividad de UPTG en estolones tuberizados (-GA3) y no tuberizados (+GA3) (Efecto de giberelina)

Como se mencionó en la introducción y en el item 1.3, las giberelinas inhiben la aparición de microtubérculos, motivo por el cual, resultó de gran interés estudiar si afectan también la actividad de la enzima involucrada en la primer etapa de la síntesis del almidón. Se determinó la actividad específica de la UPTG en explantes cultivados en presencia o en ausencia de la hormona (Tabla 9).

**Tabla 9: Efecto de giberelina sobre la actividad de UPTG en estolones tuberizados y no tuberizados**

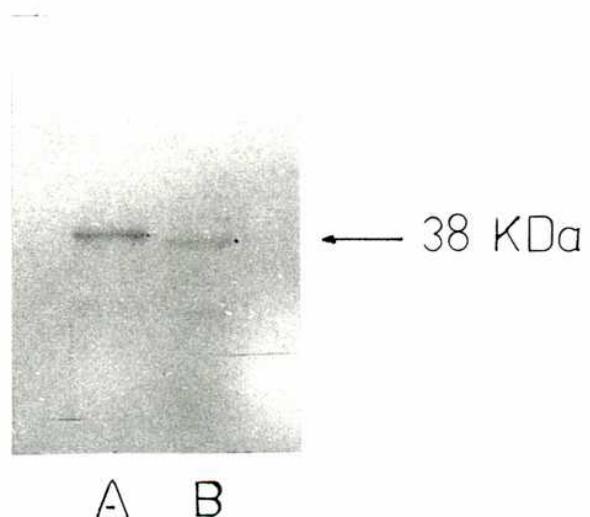
Material vegetal	Giberelina ( $10^{-5}$ M)	Act. Específica de UPTG (pmoles glc . min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteína)
Estolón tuberizado	-	30
Estolón no tuberizado	+	11

**Nota:** Los explantes fueron cultivados durante 10 días en un medio de cultivo que contenía 6% de sacarosa. En presencia de GA<sub>3</sub> se observaron estolones largos y finos y en su ausencia estolones gruesos con microtubérculos.

Se encontró una inhibición del 63% en la actividad de UPTG en estolones provenientes de explantes cultivados en presencia de GA<sub>3</sub>, con respecto a los estolones cultivados en su ausencia.

### 2.1.7 Fluorografía de los productos radioactivos de UPTG en estolones tuberizados (-GA3) y no tuberizados (+GA3)

Se realizó una fluorografía de los productos radioactivos de UPTG en estolones provenientes de explantes cultivados en presencia o en ausencia de GA3 (Fig. 10). La banda de 38 KDa correspondiente al producto de UPTG se observó más tenue en estolones cultivados en presencia de la hormona (canal B) en relación al producto sintetizado en su ausencia (canal A).

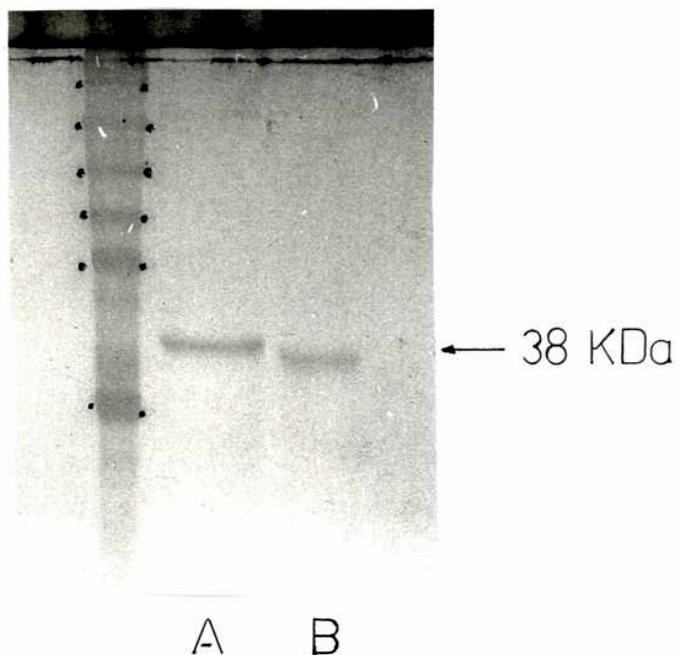


**Figura 10:** Fluorografía de los productos radioactivos de UPTG en estolones tuberizados (-GA3) (canal A) o no tuberizados (+GA3) (canal B).

### 2.1.8 Inmunodetección (Western blot) de UPTG en estolones tuberizados (-GA3) o no tuberizados (+GA3).

Al detectarse una notable disminución en la actividad de UPTG en aquellos estolones cultivados en presencia de GA3 nos pareció necesario hacer una inmunodetección de UPTG para ver si la enzima se veía afectada de algún modo a nivel de proteína.

En la calle donde se sembraron los estolones cultivados en presencia de GA3 (Fig. 11, canal B) la banda de reconocimiento de UPTG se ve menos intensa con respecto a los estolones inducidos en su ausencia (Fig. 11, canal A).



**Figura 11:** Inmunodetección de UPTG en estolones tuberizados (-GA3) (canal A) y no tuberizados (+GA3) (canal B).

## Análisis de la enzima UPTG en plántulas micropropagadas

Los trabajos realizados hasta el momento sobre la UPTG, se han llevado a cabo en tejido no fotosintético, por ello nos pareció interesante hacer un análisis de la misma en tejidos fotosintéticos.

### 2.1.9 Actividad de UPTG en distintos órganos de la plántula de papa.

Como se mencionó en la introducción, el almidón es almacenado en grandes cantidades en los vegetales en órganos de reserva (destino). Por ello no es raro que muchos de los trabajos acerca de las enzimas que participan en su metabolismo, se hallan llevado a cabo en los mismos (tubérculo de papa, endosperma de maíz, etc.) y la UPTG, la enzima involucrada en las primeras etapas de la biosíntesis no es una excepción.

Por otro lado los tejidos fotosintéticos también acumulan transitoriamente almidón en los cloroplastos durante el día. Así, para saber si la UPTG estaba presente en otros órganos además de los de reserva, se midió la actividad de la enzima en vástago y raíz de plántula micropropagada y se comparó con los datos de microtubérculo (Tabla 10).

**Tabla 10: Actividad específica de UPTG en distintos órganos de la plántula de papa.**

Órgano	Act. Específica de UPTG (pmoles glc . min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteína)
Vástago	7
Raíz	33
Microtubérculo	25

**Nota:** Se tomaron plantas micropropagadas durante 30 días en medio de subcultivo, de las cuales se separaron las raíces (1,39 g) de los vástagos (3,55 g) y se realizó la preparación enzimática igual que para microtubérculo (ver "materiales y métodos").

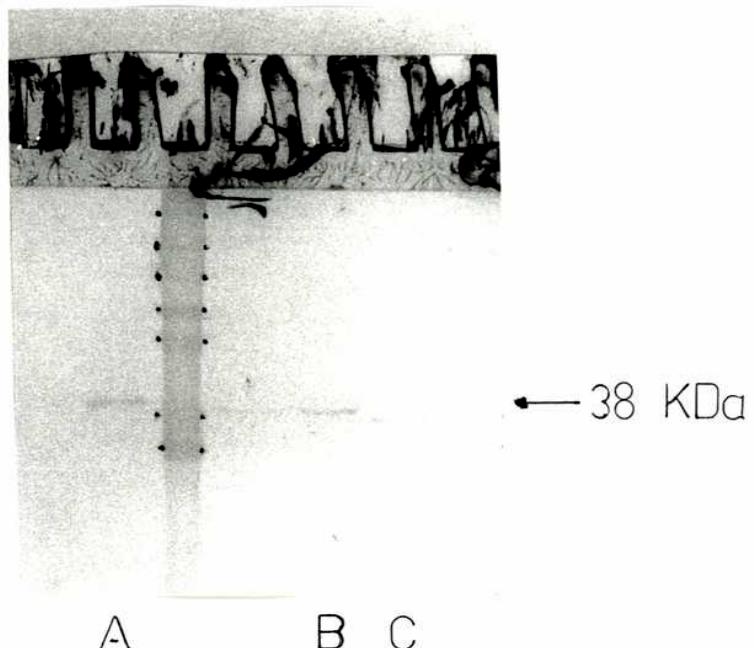
El vástago de las plantas micropropagadas comprende el tallo fotosintético y las hojas. En el vástago se encontró sólo un 20% de la actividad que se encuentra en microtubérculo; mientras que en tejido no fotosintético (raíz), la actividad de UPTG resultó ser similar a la del órgano de reserva.

#### 2.1.10 Inmunodetección (Western blot) de UPTG en distintos órganos de la plántula de papa.

Se hizo una inmunodetección de la UPTG en tallo, raíz y microtubérculo, utilizando un anticuerpo policlonal anti-UPTG de papa para ver si también reconocía la proteína enzimática en estos tejidos (Fig. 12).

Los resultados muestran que el anticuerpo anti-UPTG de papa reconoció una banda de aproximadamente 38 KDa en todos los casos.

Tanto la banda correspondiente al vástago como la correspondiente a la raíz se encuentran levemente desplazadas hacia abajo (corren más) con respecto a la de microtubérculo, siendo más notorio este efecto en el último caso.



**Figura 12:** Inmunodetección de UPTG en distintos órganos de la plántula de papa. Canal A: microtubérculo, canal B: vástago, canal C: raíz. (Las muestras se prepararon como se detalla en “materiales y métodos”)

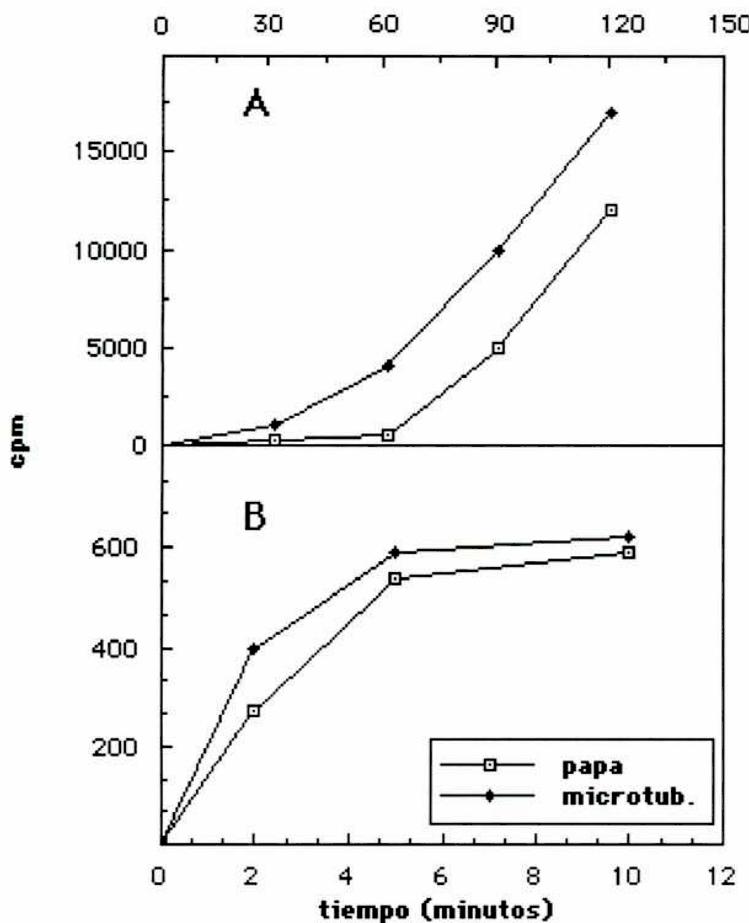
## 2.2 Análisis de fosforilasas durante la tuberización *in vitro* de *Solanum tuberosum* cv. Spunta

### 2.2.1 Propiedades cinéticas de fosforilasas en microtubérculos

Con el objeto de comparar las propiedades cinéticas de fosforilasas de papa madura cultivada en tierra, con las de microtubérculo cultivado *in vitro*, se midió la formación de producto (como se detalla en "materiales y métodos") en función del tiempo de incubación de las formas independiente (FIA) y dependiente (FDA) de aceptor exógeno (Fig. 13 A y B, respectivamente).

La cinética de fosforilasa medida en ausencia de aceptor exógeno presenta un período de latencia inicial que podría corresponder al tiempo necesario para que se forme un aceptor más eficiente para que la reacción tenga lugar (Fig. 13 A). En microtubérculo se encuentra una mayor velocidad de incorporación de glucosas con respecto a papa madura.

En cambio, la actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno presenta una reacción rápida, que alcanza un plateau de incorporación de glucosas radioactivas a los 7-10 minutos aproximadamente (Fig. 13 B). También para esta actividad se observa una mayor velocidad de incorporación de glucosas en microtubérculo con respecto a papa.



**Figura 13: Propiedades cinéticas de FIA (A) y de FDA (B).  
El ensayo se llevó a cabo con 45 $\mu$ g de proteína.**

### 2.2.2 Perfil de fosforilasas de microtubérculo luego de una cromatografía en columna de intercambio aniónico (mono Q).

Para analizar si había alguna modificación en el perfil de elución de FIA o FDA en microtubérculo con respecto a papa, se sometió la fracción soluble (S140) de la preparación enzimática de microtubérculos, a una cromatografía de intercambio aniónico en columna de mono Q.

Se obtuvieron dos picos con actividad de fosforilasa dependiente de acceptor exógeno, uno pequeño que eluye a una concentración de 0,27 M y otro mayor que eluye a 0,46 M de KCl.

La actividad de fosfoforilasa independiente de acceptor exógeno, eluyó en un solo pico a una concentración de KCl de 0,30-0,33 M. Estos resultados

coinciden con otros ya descriptos en papa cultivada en tierra (Moreno y Tandecarz, 1989).

### 2.2.3 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de fosforilasas (Efecto de sacarosa)

Como se observó que el contenido de sacarosa en los medios de inducción de la tuberización afectaba la acumulación de almidón en los microtubérculos, resultó de interés estudiar si las actividades de fosforilasas se veían también afectadas por el azúcar, ya que participan en el metabolismo del polisacárido (Tabla 11).

**Tabla 11: Efecto de sacarosa sobre la actividad de fosforilasas dependiente e independiente de aceptor exógeno.**

Sacarosa (%)	Act. específica de FIA (nmoles glc . min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteína)	Act. específica de FDA (pmoles glc .min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteína)
3	18	11
6	26	25

La actividad de FIA aumenta 44% en microtubérculos inducidos en medios que contienen un 6% de sacarosa con respecto a aquellos inducidos con un 3%, mientras que la actividad de FDA se duplica en las mismas condiciones.

2.2.4 Acción del ácido jasmónico en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de fosforilasas (Efecto de ácido jasmónico)

Como se vio que el JA jugaba un rol estimulatorio en la tuberización, se quiso analizar si también tenía algún efecto sobre las actividades de fosforilasas (Tabla 12).

**Tabla 12: Efecto del ácido jasmónico sobre la actividad de fosforilasas en microtubérculo**

Sacarosa (%)	Acido jasmónico ( $10^{-6}$ M)	Act. específica de FIA (nmoles glc . min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de proteína)	Act. específica de FDA (pmoles glc . min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteína)
3	-	18	11
3	+	17	13
6	-	26	25
6	+	28	21

No se observa efecto de JA sobre ninguna de las actividades de fosforilasa, tanto para microtubérculos inducidos en 3% como en 6% de sacarosa.

## 2.2.5 Acción de giberelinas en el medio de inducción de la tuberización sobre la actividad de fosforilasas en estolones tuberizados (-GA3) y no tuberizados (+GA3) (Efecto de giberelina)

Como se mencionó en la introducción, la GA<sub>3</sub> inhibe la tuberización, motivo por el cual se quiso saber si dicha hormona tenía también algún efecto sobre la actividad de fosforilasas. Para ello se determinó la actividad específica de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno en estolones en presencia y en ausencia de GA<sub>3</sub> (Tabla 13).

**Tabla 13: Efecto de giberelinas sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno.**

Giberelina (10 <sup>-5</sup> M)	Act. específica de FIA (nmoles glc . min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> de proteína)
-	4
+	0,3

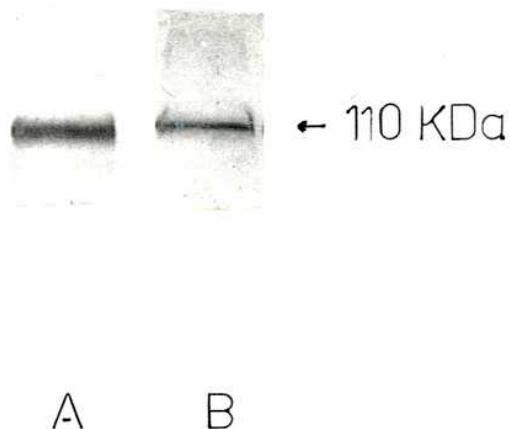
**Nota:** Los explantos fueron cultivados durante 10 días en un medio de cultivo que contenía un 6% de sacarosa.

El efecto de giberelina sobre la actividad de FDA no se determinó.

Se observó una disminución del 93% en la actividad de FIA cuando los explantos eran cultivados en presencia de la hormona.

## 2.2.6 Inmunodetección (Western blot) de fosforilasas en estolones tuberizados (-GA3) y no tuberizados (+GA3)

Para ver si la disminución en la actividad de FIA podía deberse o no a una regulación a nivel de la proteína, se realizó una inmunodetección de fosforilasa en estolones tuberizados y no tuberizados (Fig. 15). Los resultados muestran que la banda de 110 KDa correspondiente al monómero de fosforilasa, es más tenue en estolones no tuberizados (+GA3) que la de estolones tuberizados (-GA3).



**Figura 15:** Inmunodetección de fosforilasas en estolones tuberizados (canal A) y no tuberizados (canal B).

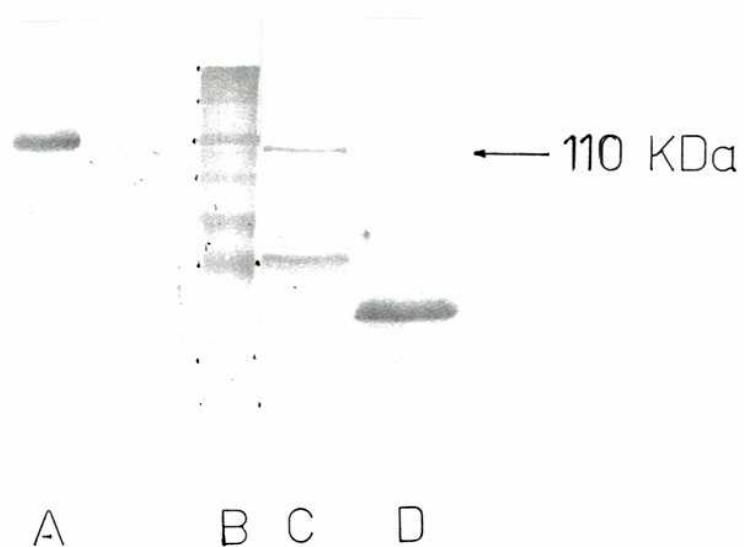
## Análisis de fosforilasas en plántula micropropagada

### 2.2.7 Inmunodetección (Western blot) de fosforilasas en plántulas micropropagadas

Debido a que recientemente se clonó una fosforilasa en hoja (tejido fotosintético) se quiso saber si ésta y la fosforilasa de tejido no fotosintético eran reconocidas por el anticuerpo anti-fosforilasa de papa. Para ello se llevó a cabo una inmunodetección en vástago, raíz y microtubérculo (Fig. 16).

Tanto en vástago como en microtubérculo, se observa una banda de 110 KDa. correspondiente al monómero de fosforilasa y algunas bandas de menor peso molecular reconocidas por el anticuerpo.

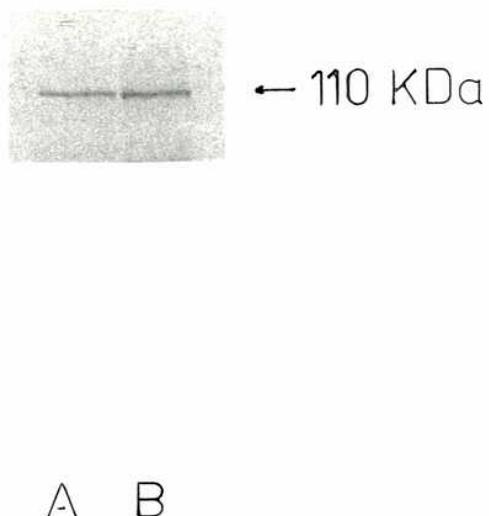
En raíz no se observa banda de 110 KDa y sólo se observa una banda de aproximadamente 50 KDa.



**Figura 16:** Inmunodetección de fosforilasas en plántulas micropropagadas. Canal A: microtubérculo, canal B: marcadores de PM, canal C: vástago, canal D: raiz.

## 2.2.8. Inmunodetección (Western blot) de fosforilasas en hojas de planta de papa

Como se vio que los microtubérculos inducidos a alta concentración de sacarosa presentan una actividad específica de fosforilasa mayor, se analizó el efecto de sacarosa sobre las fosforilasas en hojas cortadas de plantas de papa y mantenidas en medio MS con y sin el azúcar (condiciones exénicas). Se llevó a cabo una inmunodetección de la enzima con un anticuerpo anti fosforilasa de papa (Fig. 17). Se observa que en la calle donde se sembró la muestra correspondiente a la hoja mantenida en medio MS con sacarosa (canal B) la banda es más intensa que en la hoja en medio MS sin sacarosa (canal A).



**Figura 17:** Inmunodetección de fosforilasas en hojas incubadas en ausencia (canal A) o en presencia (canal B) de sacarosa.

## **2.3 Análisis de almidón sintetasas durante la tuberización *in vitro* de *Solanum tuberosum* cv. Spunta**

### **2.3.1 Análisis de almidón sintetasas en microtubérculos.**

Los microtubérculos representan tejidos muy jóvenes que están en pleno desarrollo y activa síntesis de almidón y por ello pensamos que este sería un buen sistema para estudiar las almidón sintetasas, ya que la detección de las mismas en papa madura no siempre presenta datos reproducibles. Se midió la actividad de sintetasas en una reacción en dos etapas como se indica en "materiales y métodos".

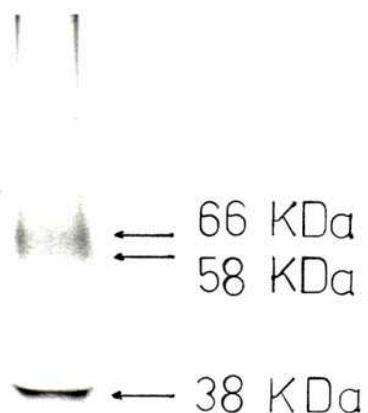
En la primera etapa de la reacción se formó el producto autoglucosilado de la UPTG (2 449 cpm que representan 3,7 pmoles de glucosas incorporadas al precipitado de TCA). Durante la segunda etapa, luego del agregado de ADP-glc o UDP-glc 1 mM, la incorporación de cuentas aumentó 3-4 veces, lo que equivale a un aumento en masa de 450-600 veces (2,3 nmoles) debido a las almidón sintetasas presentes en la preparación enzimática (Tabla 14).

Por otro lado y con el objeto de estudiar los productos radioactivos sintetizados en la reacción en dos etapas, se realizó un gel con SDS y urea y posterior fluorografía de los productos radioactivos sintetizados como se indica en la tabla 14. Se observan además de la banda de 38 KDa correspondiente al producto de UPTG, una zona difusa de bandas de alto peso molecular (entre 58 y 66 KDa) que podrían corresponder a los productos de alargamiento de la segunda etapa de incubación (Fig. 18). Este mismo comportamiento ya se había reportado en papa madura cultivada en tierra (Moreno y col., 1987).

**Tabla 14: Actividad de almidón sintetasas en microtubérculos**

Primera etapa		Segunda etapa		
Dador de glc	Tiempo de incubación (minutos)	Dador de glc	Tiempo de incubación (horas)	Radioact. Incorp. al pptado. de TCA (cpm)
UDP( <sup>14</sup> C)glc (4 $\mu$ M)	10	—	—	2449 (3,7 pmoles)
UDP( <sup>14</sup> C)glc (4 $\mu$ M)	10	+UDP-glc (1mM)	3	9421 (2,3 nmoles)
UDP( <sup>14</sup> C)glc (4 $\mu$ M)	10	+ADP-glc (1mM)	3	8123 (1,7 nmoles)

**Nota:** Cuando se midió la actividad de ADP-glc: almidón sintetasa la preparación enzimática tenía seis días más que cuando fue medida la UDP-glc: almidón sintetasa. El ensayo se realizó como se describe en "materiales y métodos".

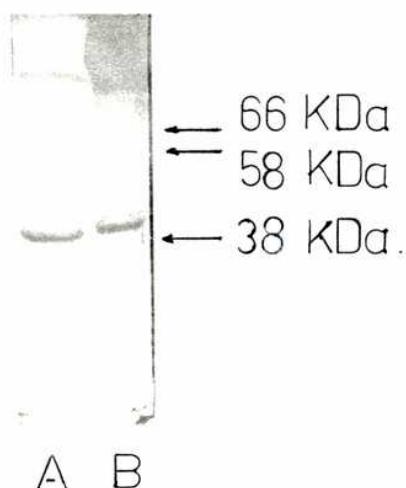


**Figura 18: Fluorografia del producto radioactivo de UDP-glc: almidón sintetasa en microtubérculo.**

El producto sintetizado en presencia de UDP-glc 1 mM en la segunda etapa de la reacción (como se indica en la tabla 14) se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior fluorografía.

### 2.3.2 Inmunodetección (Western blot) del producto de UDP-glc: almidón sintetasa en microtubérculo

Si el producto de la UPTG (proteína autoglucosilada) es usado como sustrato de las enzimas almidón sintetasas para formar una glucoproteína con cadenas de glucosa más larga, es factible que el anticuerpo anti-UPTG, reaccione con el producto de la segunda etapa de incubación. Así para ver si las bandas de alto peso molecular (entre 58 y 66 KDa) visualizadas en la fluorografía eran reconocidas por el anticuerpo anti-UPTG de papa, se hizo una inmunodetección de los productos de incubación de la UDP-Glc: almidón sintetasa. Además, con el objeto de confirmar la naturaleza glucoproteica de dichas bandas, se sembraron productos de la misma reacción tratados (canal B) y sin tratar (canal A) con amiloglucosidasa (Fig. 19).



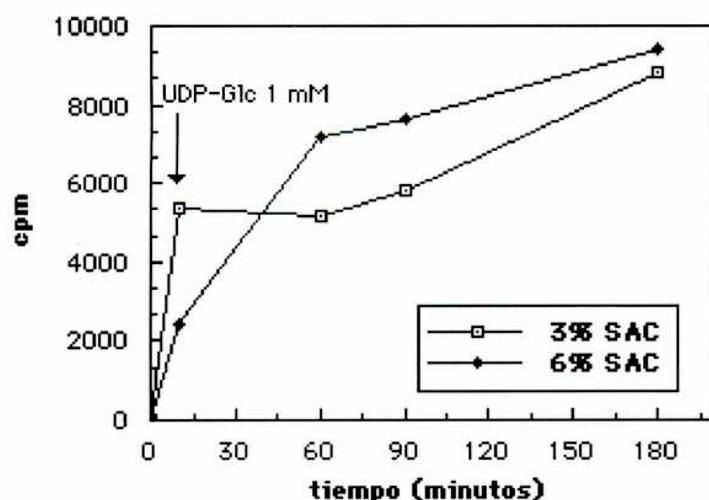
**Figura 19:** Inmunodetección del producto de UDP-glc: almidón sintetasa en microtubérculos tratados (canal B) y sin tratar (canal A) con amiloglucosidasa. El producto de la segunda etapa de incubación se obtuvo como se indica en la tala 14, se sometió a electroforesis y posterior inmunodetección con anticuerpo anti UPTG.

Se observa que el anticuerpo anti-UPTG, además de la banda de 38 KDa, reconoce dos bandas de alto peso molecular (58 y 66 KDa) detectadas antes por fluorografía. Por otro lado se confirma la naturaleza glucoproteica de dichas bandas ya que desaparecen al incubarse el producto con amiloglucosidasa (Fig. 19, canal B).

### 2.3.3 Acción de la sacarosa en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de UDP-glc: Almidón Sintetasa (Efecto de sacarosa)

Dado que en el presente trabajo nos interesa estudiar la relación entre tuberización y síntesis de almidón, resultó interesante estudiar el efecto de sacarosa sobre la actividad de UDP-glc: almidón sintetasas en microtubérculos inducidos en medios que contenían un 3% ó un 6% de sacarosa (Fig. 20).

Se observó que el producto de la primer etapa de la reacción (producto de UPTG) es mayor en microtubérculos inducidos en medios que contenían 3% de sacarosa con respecto a aquellos inducidos en medios con 6%, estos mismos resultados ya se habían observado en el ítem 2.1.2. Por otro lado se observa que en la segunda etapa del proceso (90 minutos de incubación) hay una mayor incorporación de radioactividad al precipitado de TCA en microtubérculos inducidos en medios que contenían un 6% de sacarosa con respecto a aquellos que fueron inducidos en 3%.



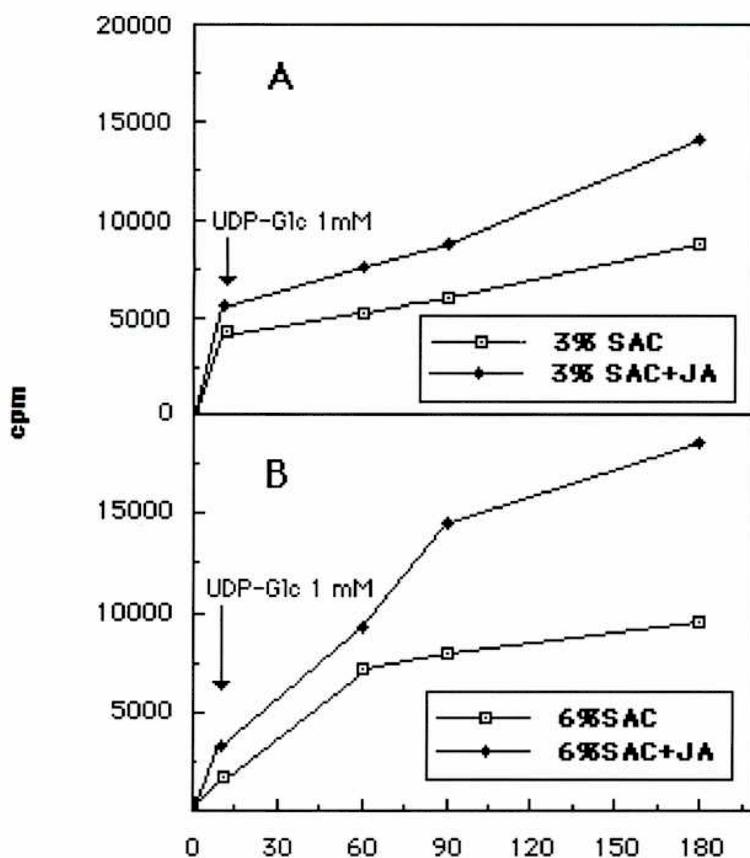
**Figura 20:** Efecto de sacarosa sobre la actividad de UDP-glc: almidón sintetasa en microtubérculos inducidos en 3% ó 6% de sacarosa. La determinación de la actividad se llevó a cabo en una reacción en dos etapas como se describe en "materiales y métodos".

#### 2.3.4 Acción del ácido jasmónico en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de almidón sintetasas (Efecto del ácido jasmónico)

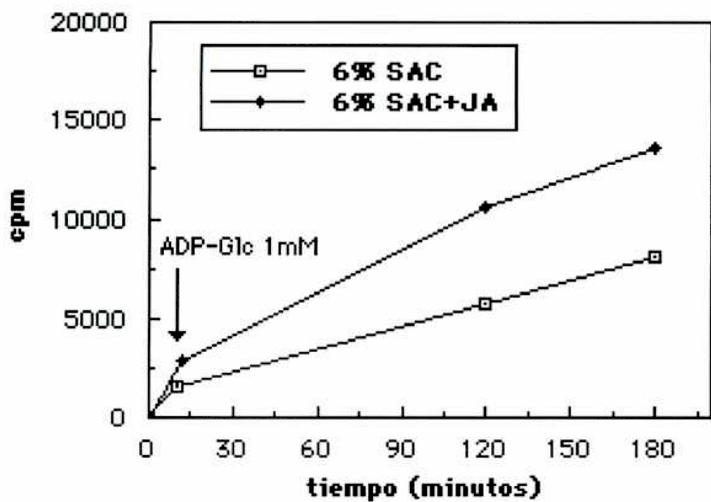
Dado que en el ítem 1.2 se había observado un efecto estimulador sobre la tuberización provocada por JA, resultó interesante estudiar el efecto del mismo sobre la actividad de almidón sintetasas.

La actividad de UDP-Glc: almidón sintetasa se determinó en microtubérculos inducidos en medios que contenían un 3% ó un 6% de sacarosa, en presencia o en ausencia de la hormona. Los resultados se muestran en la figura 21 A y B, respectivamente. Como habíamos mostrado ya en la tabla 8 en microtubérculos inducidos en medios que contenían tanto un 3% como un 6% de sacarosa, el producto de la enzima UPTG es mayor en presencia de la hormona que en su ausencia. Cuando analizamos el producto de la almidón sintetasa, también observamos una mayor incorporación de radioactividad al precipitado de TCA en presencia de JA que en su ausencia.

También se midió la actividad de ADP-glc: almidón sintetasa en microtubérculos inducidos en medios que contenían un 6% de sacarosa, en presencia o ausencia de JA (Fig. 22). Se observa una mayor incorporación de radioactividad al precipitado de TCA tanto en el producto de la primera etapa de la reacción (UPTG) como en el producto de la segunda etapa de la reacción (ADP-glc: almidón sintetasa o UDP-glc: almidón sintetasa) en presencia de JA.



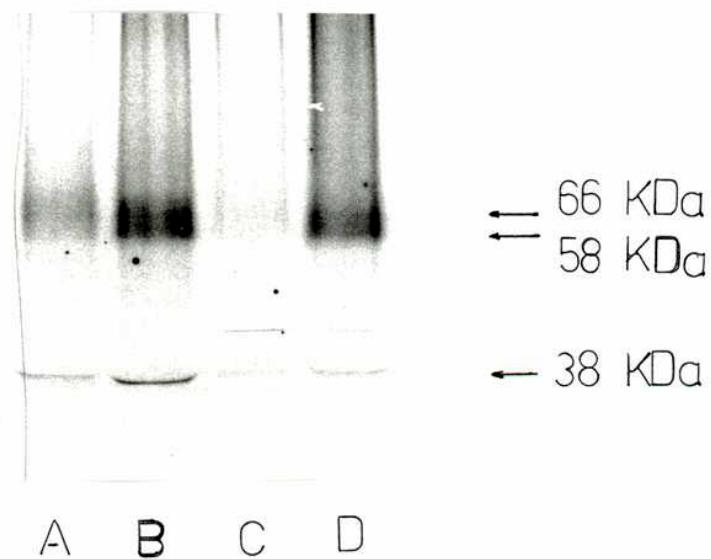
**Figura 21:** Efecto del ácido jasmónico en el medio de inducción de la tuberización sobre la actividad de UDP-Glc: almidón sintetasa en microtubérculos inducidos en medios que contienen un 3% (A) ó un 6% de sacarosa (B).



**Figura 22:** Efecto del ácido jasmónico en el medio de inducción de microtubérculos sobre la actividad de ADP-Glc: almidón sintetasa.

### 2.3.5 Fluorografía de los productos radioactivos de la reacción en dos etapas, en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de ácido jasmónico

Con el objeto de estudiar los productos radioactivos sintetizados por la UDP-glc: almidón sintetasa en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de JA, se realizó un gel desnaturizante (SDS y urea) y posterior fluorografía de las muestras. En todos los casos se observa una banda de 38 KDa correspondiente al producto de la primera etapa de la reacción (producto de UPTG) y una zona difusa de bandas de entre 58 y 66 KDa, que podrían corresponder a los productos de alargamiento de la segunda etapa (Fig. 23). Se observa que tanto la banda de 38 KDa, correspondiente al producto de UPTG, como las bandas de alto peso molecular, son más intensas en presencia de la hormona (canales 2 y 4), que en su ausencia (canales 1 y 3). También se observa que la banda de 38 KDa es más intensa en microtubérculos inducidos en 3% de sacarosa que en aquellos inducidos en 6% del azúcar, dato que concuerda con la actividad observada en las mismas condiciones (Tabla 7).



**Figura 23:** Fluorografía de los productos radioactivos de la reacción en dos etapas en microtubérculos inducidos en medios que contienen 3% (canales A y B) o 6% (canales C y D) de sacarosa en presencia (canales B y D) o en ausencia (canales A y C) de JA. Los productos se prepararon como se indica en la tabla 14 y fueron sometidos a geles de poliacrilamida con SDS y urea y posterior fluorografía.

Digitized by

## **1- Tuberización y acumulación de almidón**

### **1.1 Efecto de sacarosa**

Se encontró una correlación positiva entre la concentración de sacarosa (precursor del almidón) y el adelantamiento en la tuberización (Fig. 4, tabla 2) y también con el número y tamaño de los microtubérculos (Tabla 3).

El contenido de almidón resultó ser mayor en aquellos microtubérculos que fueron cultivados en 6% con respecto a aquellos cultivados en 3% de sacarosa (Tabla 4).

**Así, se observó un efecto marcado de la sacarosa sobre el proceso morfológico de tuberización y la acumulación de almidón.**

### **1.2 Efecto del ácido jasmónico**

Por otro lado, se estudió el efecto del ácido jasmónico (JA) sobre la tuberización *in vitro* y se encontró que en explantos cultivados a una concentración de sacarosa del 3%, JA tiene un efecto estimulador adelantando notoriamente la tuberización (Fig. 5). También Koda y Okazawa en 1988 describieron este mismo efecto para otras variedades de papa. Sin embargo no se observó efecto de Ja cuando la concentración de sacarosa en el medio de cultivo era del 6%, debido posiblemente a que a 6% habría una mayor activación del sistema que no permitiría observar los efectos del JA.

Se encontraron diferentes efectos de JA sobre la acumulación de almidón en microtubérculos cultivados en 3% ó 6% de sacrosa, durante 21 ó 35 días (Tabla 6). Al tiempo largo de cultivo, no se observaron efectos notorios de JA ni a 3% ni a 6% de sacarosa, sin embargo a tiempo corto (21 días), en los microtubérculos crecidos en 3% de sacarosa en presencia de JA, se observó un aumento de 2-3 veces en el contenido de almidón.

**El ácido jasmónico que induce la tuberización en plántulas cultivadas en 3% de sacarosa, también es responsable de un aumento en la concentración de almidón en los mismos microtubérculos. Estos datos muestran la estrecha relación existente entre el proceso de tuberización y el metabolismo del almidón.**

## **2- Enzimas de síntesis de almidón**

Para ver cómo influyen los mismos factores nutricionales y hormonales que afectan la tuberización sobre las enzimas de síntesis de almidón, se realizó el estudio bioquímico de las mismas.

### **2.1 UPTG**

La actividad específica de la UPTG disminuye cuando los microtubérculos son inducidos en un medio contenido un 6% de sacarosa con respecto a aquellos inducidos con un 3% del azúcar (Tabla 7).

Cuando se estudió el efecto de JA sobre la UPTG, se encontró que en microtubérculos crecidos tanto a 3% como a 6% de sacarosa, en presencia de la hormona en el medio de cultivo, la actividad específica de la enzima se vio aumentada de 1,5 – 2 veces (Tabla 8). Este resultado se correspondería con el aumento en la cantidad de almidón encontrado en microtubérculos cultivados en 3% de sacarosa en presencia de la hormona luego de 21 días de cultivo (Tabla 6).

Se realizó una fluorografía de productos radioactivos de UPTG en microtubérculos crecidos en 3% de sacarosa en presencia o en ausencia de JA (Fig 8). Se observó una banda de 38 KDa correspondiente al producto de UPTG, que es más intensa en presencia de la hormona que en su ausencia, confirmando entonces, el aumento de la actividad enzimática producida por el JA. Para ver si el aumento en la actividad de UPTG provocado por JA estaba relacionado con una mayor síntesis de la enzima, se hizo un Western blot de UPTG en microtubérculos inducidos en presencia o en ausencia de la hormona (Fig. 9). En ningún caso se detectó diferencia en la intensidad de la banda de 38 KDa, lo que indica que el efecto estimulatorio de JA en la actividad de UPTG no se debe a un aumento en la concentración de la enzima (de todos modos como este no es un buen método cuantitativo habría que hacer en el futuro un Northern blot que lo corrobore). Como vemos en la figura 12, la UPTG se expresa en todos los tejidos de la planta en los cuales se buscó, lo cual indica una expresión constitutiva de la misma y sugiere una regulación a nivel de su actividad.

Se determinó el efecto de giberelina (hormona inhibitoria de la tuberización) sobre la actividad de UPTG en estolones tuberizados (-GA<sub>3</sub>) y no tuberizados (+GA<sub>3</sub>)(Tabla 9). Acorde a lo esperado, cuando la hormona está presente en el medio de inducción de los microtubérculos, la actividad de UPTG se ve disminuida.

Cuando se realizó la fluorografía de los productos radioactivos de UPTG en estolones, en presencia y en ausencia de giberelina (Fig. 10) se encontró que en presencia de la hormona la banda radioactiva es más tenue, lo que concuerda con los datos de actividad.

En una inmunodetección (Western blot) de UPTG en estolones tuberizados y no tuberizados (Fig. 11), se vio que en el canal B, correspondiente a los estolones no tuberizados, la banda de UPTG era menos intensa que sin la hormona. Esto podría deberse a que la giberelina inhibía la síntesis de la proteína o que ocurra proteólisis de la misma aunque no se ven bandas de bajo peso molecular.

**Todos estos datos sugieren la existencia de un efecto directo del JA y de la GA<sub>3</sub>, que participan en la tuberización, sobre una enzima de síntesis de almidón.**

## 2.2 Fosforilasas

Se observó un efecto estimulador de sacarosa sobre la actividad de dos isoformas de fosforilasa, una independiente de aceptor exógeno (FIA) y otra dependiente de aceptor exógeno (FDA) (Tabla 11). En ambos casos la

actividad enzimática se ve aumentada en microtubérculos crecidos en alta sacarosa (6%) con respecto a aquellos crecidos en baja sacarosa (3%). Ya se había descripto un efecto estimulador de sacarosa sobre otras enzimas de síntesis de almidón, como la ADP-glc pirofosforilasa (Willmitzer et al, 1990). Al igual que para la UPTG, para las fosforilasas se observó una disminución muy marcada en ambas actividades en presencia de giberelina (Tabla 13) y por inmunodetección en estolones en presencia y en ausencia de giberelinas, se observó que la banda de 110 KDa correspondiente al monómero de fosforilasa, es más tenue en estolones no tuberizados (+GA<sub>3</sub>) que la de estolones tuberizados (-GA<sub>3</sub>) (Fig. 15). Esto sugiere que el efecto inhibitorio de GA<sub>3</sub> se debería a una regulación negativa en la síntesis de proteínas y no a proteólisis pues no se observa un aumento en la intensidad de las bandas de menor peso molecular en su presencia.

### 2.3 Almidón sintetasas

También se encontró un efecto estimulador de sacarosa sobre las almidón sintetasas en microtubérculos crecidos en 3% ó 6% del azúcar.

Al estudiar el efecto de JA sobre la actividad de las almidón sintetasas se encontró que las UDP(ADP)-glc: almidón sintetasas sufrían un aumento en su actividad cuando los microtubérculos eran cultivados tanto a 3% como a 6% de sacarosa (Fig. 20).

Se realizó una fluorografía de los productos radioactivos de UDP-glc: almidón sintetasa en microtubérculos cultivados en 3% ó 6% de sacarosa en presencia o en ausencia de JA (Fig. 23) y se observó que tanto la banda de 38 KDa correspondiente al producto de la primera etapa de la reacción (UPTG), como las bandas de 66 y 86 KDa que corresponden al producto de la segunda etapa de reacción (UDP-glc: almidón sintetasa) son más intensas en presencia de la hormona que en su ausencia, lo cual concuerda con los resultados de actividad.

En resumen, como se muestra en el esquema, el proceso de tuberización y el de biosíntesis de almidón están estrechamente relacionados entre sí:

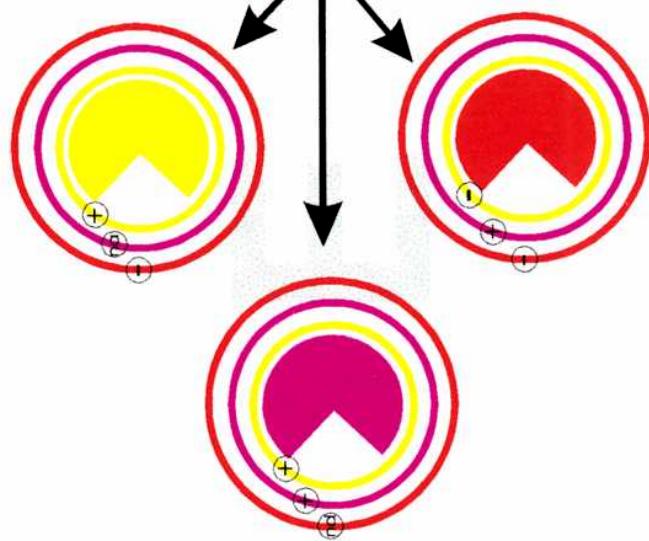
- La sacarosa que estimula la tuberización también aumenta la actividad de FIA, FDA y almidón sintetasas en microtubérculos.
- La sacarosa disminuye la actividad de UPTG en microtubérculos, podría interpretarse que al retrasarse la tuberización en explantos cultivados a 3% de azúcar, estos microtubérculos serían más jóvenes que los crecidos en 6% y por lo tanto tendrían menor contenido de almidón, lo cual favorecería las condiciones de iniciación de la biosíntesis del polisacárido.
- La giberelina que impide el proceso morfológico de la tuberización también disminuye la actividad de UPTG y FIA. Esto podría indicar que en

ausencia de tuberización hay menor expresión de las proteínas en cuestión. Para confirmarlo son necesarios datos obtenidos por Northern blot.

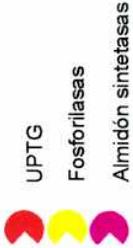
- El ácido jasmónico que induce la tuberización también estimula la actividad de UPTG y almidón sintetasas y aumenta el peso fresco de los microtubérculos. Dicho aumento se correlaciona con el contenido de almidón encontrado en microtubérculos inducidos a 3% de sacarosa a tiempos cortos de cultivo.

**La conclusión final del trabajo es que el proceso de tuberización y el de biosíntesis de almidón están estrechamente relacionados entre sí, ya que la sacarosa (precursor del almidón) estimula la tuberización y algunos factores hormonales que la controlan, también influyen sobre enzimas de la vía biosintética del polisacárido.**

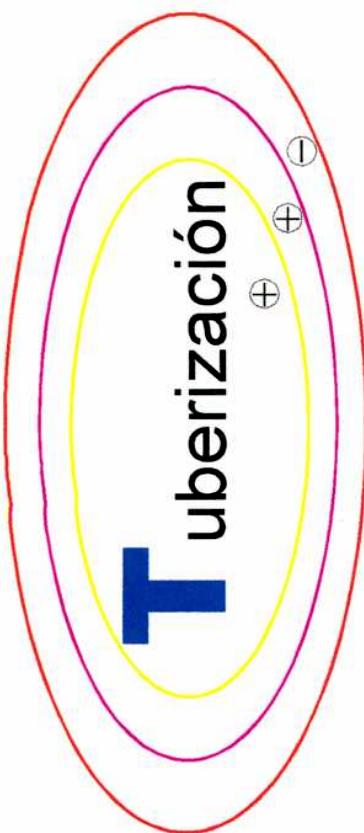
# Síntesis de almidón



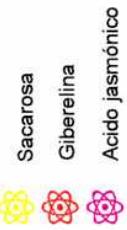
Enzimas de síntesis de almidón



# Tuberización



Factores nutricionales y hormonales



## Referencias

- Abe, M.; Shibaoka, H.; Yamane, H. y Takahashi, N. (1990) *Protoplasma* 156, 1-8
- Ardila, F. J. y Tandecarz, J. S. (1992) *Plant. Physiol.* 99, 1342-1347
- Basshman, J. A. y Krause, G. H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 189, 207-221
- Bourque, J. E.; Miller, J. C. Y Park, W. C. (1987) *In vitro cell. Dev. Biol.* 23, 381-386
- Cardini, C. E. y Frydman, R. B. (1966) *Methods Enzymol.* 8, 387-394
- Catz, D. S.; Moreno, S. y Tandecarz, J. S. (1989) *Physiol. Plant.* 76, 221-225
- Chapman, H. W. (1958) *Physiol. Plant.* 11, 215-224
- Davies, P. J.; Birnbergg, P. R.; Maki, S. L. y Brenner, M. L. (1986) *Plant Physiol.* 81, 991-996
- Foster, K. R.; Miller, F. R.; Childs, K. L. y Morgan, P. W. (1994) *Plant Physiol.* 105, 941-948
- Frydman, R. B. y Cardini, C. E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 312-317
- Garner, N. y Blake, J. (1989) *Annals of Botany* 63, 663-674
- Gerbrandy, S. J. y Verleur, D. (1971) *Phytochemistry* 10, 261-266
- Gregory, L. (1956) *Amer. J. Bot.* 43, 281-288
- Green, D. E. y Stumpf, P. K. (1942) *J. Biol. Chem.* 142, 355-363
- Hawker, J. S.; Marschner, H. y Krauss, A. (1979) *Physiol. Plant.* 46, 25-30
- Heber, U. y Santarius, K. A. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 109, 390-408
- Illingworth, B.; Brown, D. H. y Cori, C. F. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47, 469-485
- Jackson, S. D.; Heyer, A.; Dietze, J. y Prat, S. (1996) *Plant J.* 9, 159-166
- Koda, Y y Okazawa, Y. (1988) *Plant cell Physiol.* 29, 1047-1051

- Koda, Y.; Kikuta, Y.; Tazaki, H.; Tsujino, Y.; Sakamura, S. y Yoshihara, T. (1991) *Phytochemistry* 30, 1435-1438
- Krisman, C. R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1206-1212
- Kumar, D. y Wareig, P. F. (1973) *New Phytol.* 72, 283-287
- Lavintman, N. y Cardini, C. E. (1973) *FEBS Lett.* 29, 43-46
- Leloir, L. F. y Cardini, C. E. (1960) En "Las enzimas" 2<sup>a</sup> ed, vol. 2 , 39-61 Academic Press, Nueva York
- Matsuki, T.; Tazaki, H.; Fujimori, T. y Hogetsu, T. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1329-1330
- Moreno, S. y Tandecarz, J. S. (1982) *FEBS Lett.* 139, 313-316
- Moreno, S. y Tandecarz, J. S. (1989) *Biochemistry International* 18, 1229-1235
- Mori, H.; Tanizawa, K. y Fukui, T. (1991) 266, 18446-18453
- Müller-Röber, B. T.; Koßmann, J.; Hannah, L. C.; Willmitzer, L. y Sonnewald, U. (1990) 224, 136-146
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* 15 473-479
- Pazur, J. H. (1965). En "Starch: Chemistry and Technology" (Whistler, R. L. y Paschall, E. F., eds.) 1, 133-171. Academic Press, Nueva York y Londres
- Pelacho, A. M. y Mingo-Castel, A. M. (1991) *Plant Physiol.* 97, 1253-1255
- Pena-Cortés, H.; Liu, X. Sánchez-Serrano, J. Schmid, R. y Willmitzer, L. (1992) *Planta* 186, 495-502
- Preiss, J. y Levi, C. (1980) En "Biochemistry of Plants" (Preiss, J.; ed.) 3, 371-423. Academic Press, Nueva York, Londres, Toronto, Sidney y San Francisco
- Recondo, E. F. y Leloir, L. F. (1961) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 6, 85-88
- Rivas, L. A. y Pont Lezica, R. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 135-140
- Rothschild, A. y Tandecarz, J. S. (1994) *Plant Sci.* 97, 141-148
- Shimomura, S.; Nagai, M. y Fukui, T. (1982) *J. Biochem.* 91 703-717

- Shneider, E. M.; Becker, J. U. y Volkmann, D. (1981) *Planta* 151, 124-134
- Sonnewald, M.; Bosner, A.; Greve, B. y Steup, M. (1995) *Plant. Mol. Biol.* 27, 567-576
- Statswick, P. E. (1992) *Plant Physiol.* 99, 804-807
- Tandecarz, J. S.; Lavintman, N. y Cardini, C. E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 399, 345-355
- Tizio, R. (1971) *Potato Res.* 14, 193-204
- Van den Berg, J. H.; Davies, P. J.; Ewing, E. E. y Halinska, A. (1995) *j. Plant Physiol.* 146, 467-473
- Willmitzer, L. (1990) *Mol. Gen Genet.* 224, 136-146

