Biblioteca Digital
FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio de la fisiología y metabolismo en plantas de Solanum Tuberosum obtenidas por variación somaclonal

Marconi, Patricia Laura

1998

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en 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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Marconi, Patricia Laura. (1998). Estudio de la fisiología y metabolismo en plantas de Solanum Tuberosum obtenidas por variación somaclonal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3038_Marconi.pdf

Cita tipo Chicago:
Marconi, Patricia Laura. "Estudio de la fisiología y metabolismo en plantas de Solanum Tuberosum obtenidas por variación somaclonal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3038_Marconi.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS DE DOCTORADO

ESTUDIO DE LA FISIOLOGÍA Y METABOLISMO EN PLANTAS DE *Solanum tuberosum* OBTENIDAS POR VARIACION SOMACLONAL

PATRICIA LAURA MARCONI

DIRECTOR: Dr. OSVALDO H. CASO

1998

Nº 3038

Dedicado a mis padres,
mi esposo Juan,
mi hija María Sol
y mi tía Celia

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS 5

RESUMEN 7

ABSTRACT 8

ABREVIATURAS 9

INTRODUCCIÓN

- ESTRÉS ABIÓTICO 12
- BIOTECNOLOGÍA Y ESTRÉS 14
- *Solanum tuberosum ssp tuberosum* 16
- CULTIVAR KENNEBEC 17
- OBTENCIÓN DEL CLON 150 19
- HIPÓTESIS DE TRABAJO 20
- OBJETIVOS 20

♣ CAPÍTULO 1 ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS SOMETIDAS AL ESTRÉS SALINO.

- INTRODUCCIÓN 22
- MATERIALES Y MÉTODOS 24
- RESULTADOS 28
- CONCLUSIONES 33

♣ CAPÍTULO 2 COMPORTAMIENTO A CAMPO DEL CLON 150.

INTRODUCCIÓN 40

MATERIALES Y MÉTODOS 41

RESULTADOS 44

CONCLUSIONES 47

♣ CAPÍTULO 3 ESTRÉS OXIDATIVO COMO CONSECUENCIA DEL ESTRÉS SALINO.

INTRODUCCIÓN 56

MATERIALES Y MÉTODOS 62

RESULTADOS 68

CONCLUSIONES 71

♣ CAPÍTULO 4 COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO ENTRE CALLOS Y PLANTA.

INTRODUCCIÓN 79

MATERIALES Y MÉTODOS 80

RESULTADOS 83

CONCLUSIONES 88

♣ CAPÍTULO 5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL CLON 150.

INTRODUCCIÓN 98

MATERIALES Y MÉTODOS 101

RESULTADOS 104

CONCLUSIONES 105

DISCUSIÓN 109

BIBLIOGRAFÍA 116

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Osvaldo H. Caso como Director de mi Tesis y del Instituto. Por su infinita paciencia y dedicación hacia mi trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Guillermo Santa María por la revisión crítica del presente manuscrito.

A la Ing. Agr. Silvia Radice por su apoyo incondicional hacia mi persona. Además, fue ella misma quien realizó mi entrenamiento en el laboratorio de cultivo de tejidos, por lo que le debo todo lo que sé en dichos temas.

A la Dra. María Patricia Benavides por ser una compañera inestimable, por su apoyo logístico y su colaboración en varios de los ensayos aquí descriptos.

Al Dr. Sergio Ochatt en cuyo trabajo original se basa la siguiente Tesis.

Al Lic. Claudio Robredo por su dedicación, apoyo incondicional y paciencia. Y por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Marta Collantes por su apoyo y consejos durante la cursada de la carrera de doctorado.

Al Lic. Patricio Esteves y la Ing. Agr. Cristina Pomar por su colaboración en algunos de los ensayos aquí descriptos.

A los miembros del personal de apoyo y compañeros del CEVEG, en especial al Sr. Jorge Galván, Sr. "Tito" Giuliano, Sra. "Pachi" Mazzioti y Lic. Florencia Trama.

A los miembros de los siguientes laboratorios donde se realizaron varios de los ensayos aquí descriptos:

Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA:
Dra. María Lujan Tomaro
Dra. María Patricia Benavides
Dra. Susana Gallego
Bioq. María Eugenia Comba

CICA-INTA-Castelar:
Lic. Claudio Robredo
Ing. Agr. Pascual Franzone
Ing. Agr. Raúl Rios
Ing. Agr Díaz

LAQIGE-CONICET
Dr. E Chaar
Lic. Roberto Vela

PRINFIVE-UNLP
Ing. Agr. Daniel Caldiz

Un agradecimiento muy especial al Dr. Guillermo Santa María por su ayuda en la revisión crítica del presente manuscrito.

RESUMEN

La presente Tesis se basa en la caracterización fisiológica, bioquímica y genómica de plantas de papa (*Solanum tuberosum spp. tuberosum*). Las mismas fueron obtenidas por cultivo *in vitro* luego de aplicar un mecanismo de selección recurrente con ClNa. A partir de los callos tolerantes a 150 mM de cloruro de sodio agregado al medio de cultivo se regeneraron plantas por embriogénesis somática denominadas clon 150 (Ochatt et al., 1998).

El crecimiento, la distribución de asimilados y de los iones sodio y potasio fueron diferentes entre ambos clones. El clon 150 fue más tolerante a elevadas concentraciones externas de ClNa que el clon T. Los medios de cultivo con elevadas concentraciones de ClNa provocaron un estrés oxidativo. Las plantas del clon 150 mostraron una rápida y eficiente respuesta antioxidante a diferencia del clon T. Los análisis comparativos entre ambos clones a nivel de callos mostraron un patrón parecido al de los de planta entera, a excepción de la respuesta antioxidante. Además, se observó una correlación positiva para la acumulación de Na^+ y K^+ entre ambos niveles de organización.

Los patrones de isoenzimas y RAPD, sumados a las diferencias anatómicas y fisiológicas descriptas, sugieren que el clon 150 difiere genéticamente del cultivar Kennebec. Estas diferencias son particularmente importantes para el crecimiento y la respuesta fisiológica de ambos genotipos cuando son cultivados en condiciones de estrés salino.

ABSTRACT

This Thesis attempt to made a physiological, biochemical and genomical characterization of potatoes plants (*Solanum tuberosum spp. tuberosum*) that were obtained by *in vitro* culture through recurrent selection. Cell line originated from Kennebec cultivar showed to be able to growth on a medium with 150 mM NaCl. Plants obtained by somatic embryogenesis from this cell line were named as 150 clone (Ochatt et al., 1998).

Plant growth, assimilate and sodium and potassium distributions differed between the 150 clone and the control Kennebec cultivar. The 150 clone was also salt-tolerant at relatively high NaCl concentrations.

Oxidative stress was observed when plants of both clones grown on saline medium. Plants of clone 150 showed a rapid and efficient response to oxidative stress, a pattern that was not observed for the Kennebec clone.

Comparative analysis between clones at the callus level shown a similar pattern than that observed for whole plants, although the oxidative defense was not detected. Likewise, a positive correlation was obtained for the accumulation of Na^+ and K^+ between both organization levels.

The pattern here describe for isozymes and RAPD´s analyses, in addition to the anatomical and physiological differences above outlined, strongly suggest that the clone 150 differs genetically from the control Kennebec cultivar. These differences are likely to be especially relevant for the growth and the whole physiological response of both genotypes under salt stress conditions.

ABREVIATURAS

$A^{\bullet}$ red.	ascorbato reductasa
ADH	ascorbato deshidrogenasa
ADN	ác. Desoxirribonucléico
ANA	ác. α-naftalen-acético
ANOVA	análisis de la varianza
ASC	ác. ascórbico
AP	ascorbato peroxidasa
ARN	ác. ribonucléico
BAP	6-benzilaminopurina
CAT	catalasa
CH	caseina hidrolizada
ClH	ác. clorhídrico
ClK	cloruro de potasio
Cl_2Mg	bicloruro de magnesio
ClNa	cloruro de sodio
CO_2	dióxido de carbono
C.P.V.	volumen de empaquetado celular
cv.	cultivar
2,4-D	ác. 2,4-diclorofenoxiacético
DHA	dehidroascorbato
DHAR	dehidroascorbato peroxidasa
DHR	dehidroascorbato reductasa
DTNB	ác. 5, 5-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	ác. etilen diamino tetracético
GDH	glutatión deshidrogenasa
GR	glutatión reductasa
GSH	glutatión reducido
GSSG	glutatión oxidado
$HO^{\bullet}$	hidroxilo
H_2O	agua
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
IBA ác.	indol-3-butírico
K^+	potasio
K_2HPO_4	fosfato ác. de potasio
KIN	cinetina
LaCs	lantano cesio
LAR	peso foliar relativo
LPOx	lipoxigenasa
LWR	tasa relativa del peso foliar
MDA	malón dialdehído
MDH	málico deshidrogenasa
MHAR	monodehidroascorbato reductasa
mM	milimolar
MS	sales de Murashige and Skoog (1964)
Na^+	sodio

NAD(P)	nicotin adenin dinucleótido fosfato
NAR	tasa de asimilación neta
NBT	nitroblue tetrazolium
$^1O_2$	oxígeno singulete
$O_2^{\cdot-}$	anión superóxido
RGR	tasa relativa de crecimiento
PEG	polietilen glicol
PF	peso fresco
PS	peso seco
PIC	Picloram (ác. 4-amino- 3, 5, 6-tricloropicolínico)
PVP	polivinil pirrolidona
SLA	área foliar específica
SOD	superóxido dismutasa
SO_4Na_2	sulfato de sodio
T	clon testigo
TBA	ác. tiobarbitúrico
TCA	ác. tricloroacético
TNB	ác. 5-tio-(2-nitrobenzóico)
Z	zeatina

R

ESTRÉS ABIÓTICO

Las prácticas agrícolas están provocando procesos erosivos crecientes en amplias zonas de América Latina (Jaffé and Rojas, 1994, Sasson, 1990). La presión creada por la expansión de la agricultura vuelve a los suelos más vulnerables, y los más pobres suelen ser los más afectados (Epstein and Rains, 1987). La principal dificultad que los agricultores deben afrontar en estas áreas son, con frecuencia, las diferentes formas del estrés abiótico que sufre la vegetación. Dentro de los procesos adversos que afectan las tierras, los más comunes son la desertificación y la salinización (Szabolcs, 1991, Sasson, 1990). Si bien ambos procesos exhiben diferencias, están relacionados ya que la desertificación comúnmente induce un incremento de la salinización (Szabolcs, 1991).

Aún cuando la salinización es un fenómeno complejo la misma resulta, en forma primaria, de la acumulación de sales solubles en la solución del suelo. Estas sales pueden ser de diferentes especies químicas (Ca^{++}, Na^{+}, $SO4^{-}$, Cl^{-}, etc.) y cada una o el conjunto de ellas va a producir daños a los cultivos. El régimen hídrico del suelo desempeña un papel crítico en determinar la frecuencia, intensidad y duración de esta condición de estrés. El origen del proceso erosivo puede ser intrínseco del lugar o puede ser inducido por la irrigación. Los problemas más frecuentes en estas áreas provienen de : a) el uso incontrolado del agua de riego y la falta de un drenaje adecuado, b) el ascenso de las napas freáticas y la falta de drenajes profundos de las mismas, c) lavado de los suelos, d) contaminación del agua por desperdicios industriales (Paleka, 1985). Como consecuencia secundaria de ello se produce la salinización, alcalinización y, eventualmente, la desertización (Rains, 1991, Szabolcs, 1991). El impacto social producido por el mal manejo de los ecosistemas es importante. Cuanto más vulnerables son los ecosistemas, más propensos son a las consecuencias del mal manejo y esto ocurre precisamente en las regiones áridas y semiáridas (Paleka, 1985, Jaffé and Rojas, 1994).

La tercera parte del planeta está constituida por regiones áridas o semiáridas. A través del tiempo, vastas regiones se han perdido en forma irrecuperable. En nuestro país, el setenta y cinco por ciento (75%) del territorio tiene un clima árido y

semiárido. Los biomas áridos son tres: Patagonia, Puna y Monte (Paleka, 1985, Szabolcs, 1991). En la región semiárida la producción agropecuaria suele explotarse en "islas" irrigadas, como en Mendoza, Córdoba o Río Negro.

La necesidad de expandir las prácticas agrícolas hacia zonas consideradas marginales y la recuperación de zonas perdidas por la progresiva salinización, alcalinización o desertización provocan la necesidad de encontrar una solución a la limitación de la productividad de los cultivos en estas áreas. Tal solución estriba en la adopción de dos alternativas (Epstein, 1983):

a) modificar el suelo para hacerlo apto para los cultivos

b) modificar los cultivos para que toleren las nuevas condiciones edáficas

Desde 1950 a 1970 la producción agrícola aumentó como resultado de trabajar sobre la primera hipótesis. El comienzo del riego en los campos posibilitó un crecimiento anual del 3% en los rindes (Sasson, 1990). Sin embargo, la ganancia de nuevos terrenos y la modificación de los ecosistemas naturales fue haciendo cada vez menos posible el empleo de esta metodología debido al alto costo que ello demanda. Además, la erosión y salinización provocada comenzaron a reducir los campos aptos para el cultivo.

Hasta 1960, aproximadamente, la única forma de trabajar basándose en la segunda hipótesis era por los métodos clásicos de la genética, por medio de cruzamientos y la posterior selección de los individuos buscados. La obtención de nuevas variedades en maíz, trigo y arroz posibilitó un aumento de la producción en los países desarrollados (Sasson, 1990). A partir de esa década se comenzó a introducir mejoras en los cultivos por medio de la biotecnología. La adaptación de los cultivares a los ecosistemas fue menos costosa (en términos termodinámicos y económicos) y más factible.

BIOTECNOLOGÍA Y ESTRÉS

A partir de la mitad de la década del ´70 comenzó una ¨nueva revolución verde¨ dada por una nueva metodología para la selección y propagación de nuevas variedades sin la intervención de entrecruzamientos. El desarrollo de la Biotecnología Vegetal permitió la obtención y propagación de individuos a partir del cultivo de protoplastos, células, órganos y tejidos *in vitro* (Sasson, 1989). Se observó que líneas celulares provenientes de una misma planta madre, después de un tiempo en cultivo, sufrían numerosos cambios. La uniformidad clonal dada por el cultivo *in vitro* y propuesta por algunos investigadores pasó a ser un tema de discusión. Larkin y Scowcroft (1981) comenzaron a estudiar este fenómeno en la década del ´80, que parecía no ser un artificio de la técnica, sino una fuente nueva de variación genética. Dicha variación genética inducida por el cultivo *in vitro* se denomina variación somaclonal.

Sin embargo, la variación en el fenotipo de una línea celular puede ser de origen epigenético o genómico (Chaleff, 1983). El primero es una alteración en los niveles de expresión de los genes, los cuales son relativamente estables y al heredarse por mitosis son expresados por las células hijas. Pero la alteración en los patrones de expresión no es heredable a través de la reproducción sexual, ya que el acervo genético de esas plantas está intacto y sujetos a reversiones.

Los cambios epigenéticos pueden estar dados por modificaciones en los procesos de metilación del ADN. Recientemente se le ha atribuido al cultivo *in vitro* un desbalance en el pool de nucleótidos, los cuales están involucrados en la replicación y reparación del ADN (Phillips et., 1990). Cuando el ADN se replica y está altamente metilado, tiende a abrir sus hebras. Ello induce errores en los patrones de metilación y, por consiguiente, variaciones en la expresión (Epstein and Rains, 1987, Phillips et al., 1990).

Muy por el contrario, las alteraciones de origen genómico son heredables y pueden detectarse por análisis de entrecruzamientos, citogenéticos, patrones de isoenzimas o RAPD (Bajaj, 1987, Chaleff, 1983, Rasmussen and Rasmussen, 1995,

Franzone et al., 1996, Ochatt, 1996, Tal, 1996). Jacobs y colaboradores (1987) establecieron un criterio fácil de clasificación de la variación fenotípica a partir del cual se puede establecer si el origen es epigenético o genómico. Así, por ejemplo, si la variación es heredable a través de cruzamientos, y si se observa una estabilidad genética o cambios en patrones bioquímicos o genómicos, la alteración puede atribuirse a un cambio de origen genómico. Las mutantes pueden ser obtenidas por medio de varios sistemas de cultivo, como ser: protoplastos, suspensiones celulares y callos (Tal, 1996, Jacobs et al., 1987). Estos sistemas de cultivo tienen en común células en un estadio indiferenciado. Sumado a esto, se ha observado que las frecuencias de cambios a nivel genético se hallan relacionados con los períodos de cultivo en el cual las células se han dividido numerosas veces (Phillips et al., 1990). Esto puede deberse a que un alto número de mitosis no sean polares, en consecuencia la probabilidad de aberraciones cromosómicas es más alta. También pueden ocurrir crossing over o configuraciones alélicas diferentes que den lugar a las mutaciones (Sasson, 1989).

Una vez inducida la variación genómica deben aislarse las células mutantes para iniciar las líneas correspondientes. Generalmente esto se lleva a cabo a través de un método de selección recurrente positiva. La presión selectiva la puede ejercer un agente químico tóxico, como una sal o herbicida, o un estrés físico (Jacobs et al., 1987). Los eventos mutacionales que se han observado son numerosos. Los más frecuentes son: mutaciones puntuales, cambios genéticos que afectan caracteres que están bajo el control de una familia multigénica, traslocaciones, inversiones, deleciones, rearreglos cromosómicos. También son frecuentes las alteraciones numéricas como la aneuploidía y poliploidía (Scowcroft et al., 1987, Bajaj, 1987).

Las ventajas que presenta esta metodología para su uso en planes de mejoramiento vegetal son:

- la relativa facilidad del cultivo *in vitro* de células y tejidos y la rápida obtención de resultados (Singh, 1989).
- la caracterización de marcadores fisiológicos celulares asociados al carácter buscado, por ejemplo resistencia a estrés biótico o abiótico (Epstein and Rains, 1987)

- la manipulación en gran escala, lo que incrementa las probabilidades de encontrar las variantes buscadas (Epstein and Rains, 1987)
- no es necesario conocer a priori la o las partes del genoma que le confieren la resistencia buscada (Epstein and Rains, 1987)
- factibilidad económica, los requerimientos en equipamiento y drogas son menores, por ejemplo, a los empleados en ensayos de biología molecular (Sasson, 1990).

Sin embargo, ya que las mutaciones inducidas por el cultivo *in vitro* no pueden ser dirigidas, las células del callo son las sometidas a un agente físico o químico de selección, generalmente en condiciones no fisiológicas. Por lo tanto, luego de aplicar esta metodología se deben hacer estudios que determinen si las nuevas plantas son o no mutantes, y si las mutantes obtenidas tienen las características buscadas. Para ello, se deben analizar las características varietales del cultivo y determinar si éstas se encuentran asociadas al comportamiento observado *in vitro* respecto del nuevo clon (Bajaj, 1987).

Esta técnica ha sido aplicada en numerosas plantas de importancia económica, por ejemplo: batata resistente a estrés salino y sequía (Chávez et al., 1995), Bromus inermis con características agronómicas (Wattanasiri and Walton, 1997), Populus sp. con mayor rendimiento (Saieed et al., 1994), arroz tolerante a la sal (Winicov, 1996), tomate y papa resistentes a numerosos tipos de estrés (Ayers and Shepard, 1981, Bajaj, 1987, Tal, 1996, Ochatt, 1996), Citrus resistente a ClNa (Garciagustin and Primonillo, 1995), líneas de Pissum sativum resistentes a estrés salino (Olmos et al., 1994) y otros (Sasson, 1989).

Solanum tuberosum ssp tuberosum

La papa, como se la conoce hoy en día, proviene de la domesticación de la especie *Solanum tuberosum* en la región del lago Titicaca (actualmente los Andes de Bolivia y Perú) hace aproximadamente 8.000 años. La selección de clones cultivables por el hombre data de aquella época (Miller and Lipchutz, 1984, Brown, 1990). Las

cualidades nutricionales son numerosas, entre ellas se puede destacar el adecuado balance de aminoácidos esenciales (Bajaj, 1987). Además tiene la capacidad de producir más energía y proteínas por unidad de campo que cualquier otro cultivo comestible (Bajaj, 1986). La subespecie *tuberosum* es cultivada en el hemisferio Norte y Sur, crece en regiones tropicales y subtropicales, aunque también se cultiva en climas templado-fríos como Polonia, Rusia, Irlanda y en nuestro país en la región sudeste de la provincia de Buenos Aires, sur-oeste de Córdoba, Mendoza y Salta. En la actualidad, la papa ocupa el tercer lugar en cuanto al valor de la producción y quinto en la contribución de calorías a la población del tercer mundo. Este cultivo requiere bajos insumos y su rendimiento es alto por lo que es propicio para agricultores de bajos recursos.

El tubérculo contiene aproximadamente un 75 a 80% de agua, el resto se compone de hidratos de carbono (2,5 a 3%) y proteínas (1,2 a 2,2%). La concentración de minerales es alta, exhibiendo un alto porcentaje de potasio y bajo de sodio. Además posee pocas fibras (0,006 %) y una alta concentración de vitaminas C, B1 y B2 (Bajaj, 1987).

Cultivar Kennebec

Las variedades de papa son numerosas y están continuamente en desarrollo. El catálogo holandés (Catálogo Holandés de Variedades de Patata, 1994) ofrece 115 variedades con distintas cualidades agronómicas que las hace específicas para cultivar en determinadas regiones o para usos específicos. Entre ellas se encuentra la descripción del cultivar Kennebec (Tabla 1). El mismo es un tetraploide proveniente de los cultivares Chippewa X Katahdin X Earlin X W-ras, de maduración semitemprana a semitardía. Las características principales son: su alto rendimiento, con contenido mediano de materia seca; la cual la hace muy preciada para cocinarlas fritadas. La floración es escasa con flores pequeñas y blancas (Figura 1). Otra característica importante es su resistencia a *Phytophtora* y al virus A.

Tabla 1: Características agrícolas y morfológicas del cultivar Kennebec de *S. tuberosum* (Catálogo Holandés, 1994).

Características agrícolas

maduración

↳ de semitemprana a semitardía

tubérculos

↳ grandes, de forma regular, carne blanca y ojos superficiales

rendimiento

↳ de bueno a muy bueno

contenido de materia seca

↳ mediano

calidad culinaria

↳ firme al cocer y bastante puro de color

follaje

↳ es de hojas grandes, cubriendo bien el terreno y resiste muy bien a las sequías

enfermedades

↳ poco sensible a *Phytophtora*, muy resistente al virus A, y poco sensible al virus Y

Las características morfológicas

planta

↳ tallos verdes, pocos numerosos y gruesos, extendiéndose poco; hojas muy grandes, rígidas de color verde claro; folíolos primarios grandes y ovales, con nervios superficiales; floración muy escasa, inflorescencias pequeñas, pocas flores de color blanco

tubérculos

↳ de forma oval redondeada; piel amarilla clara y lisa; carne blanca; ojos superficiales

brote

↳ al principio elipsoidal, más tarde oval alargado, de color predominantemente verde, en la base rojo morado pálido, poco piloso; yema terminal bastante pequeña, verde, cerrada; muchas yemas laterales en forma de estolones

Figura 1: Aspecto general del cultivo de *Solanum tuberosum* cv. Kennebec en floración.

OBTENCIÓN DEL CLON 150

A partir de hojas de *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* cv. Kennebec se iniciaron varias líneas de callos cultivados *in vitro* (Ochatt et al., 1998). Luego de doce meses en cultivo los mismos fueron sometidos a una selección recurrente con diferentes concentraciones de ClNa (0, 60, 90, 120, 150, 300 y 450 mM). Los callos crecidos en 120 y 150 mM de ClNa tuvieron el mayor peso fresco respecto del resto de los tratamientos. Para determinar la toxicidad específica de los iones, los callos se repicaron al mismo medio de cultivo pero con el agregado de ClK o SO_4Na_2 en concentraciones equimolares. También se repicó en medio con PEG 6000 para determinar el impacto del estrés osmótico. La toxicidad fue Na+ específica y no se observó una mayor contribución del estrés osmótico a la disminución del rendimiento. Las plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir de la línea celular resistente a concentraciones de 150 mM de ClNa en cultivo dieron origen al clon 150. Las mismas fueron micropropagadas en medios de multiplicación *in vitro* por un lapso de cuatro años. Luego de este período se inició un ensayo para estudiar la estabilidad fenotípica y su comportamiento frente al estrés salino (Marconi, 1992, Ochatt et al., 1998).

Las plantas del cv. Kennebec (clon T) y las regeneradas (clon 150) fueron rusticadas en un invernáculo y luego de su aclimatación se las pasó a macetas (de 800 cm3) con perlita. A la solución de riego (Hoagland and Arnon, 1957) se le agregó ClNa (0, 30, 60, 90 y 120 mM) para inducir el estrés salino. Las plantas del clon 150 mostraron una mayor tolerancia al estrés generado que las T. Estos resultados se reflejaron en el número de tubérculos por planta, y en la morfología de las hojas y la coloración de la piel y pulpa de los tubérculos a todas las concentraciones de sal estudiadas. El clon 150 también tuvo un mayor rendimiento a concentraciones de 90 mM de sal que se reflejó en el peso fresco del vástago y la raíz.

Los resultados permitieron concluir que el clon 150 es estable fenotipicamente con y sin presión selectiva y es diferente al clon Kennebec.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La papa es una de las especies dicotiledóneas más importante, en términos económicos, del mundo. Para iniciar su cultivo requiere la irrigación de los suelos. Esto último puede provocar los efectos secundarios analizados previamente con la consiguiente disminución de los rendimiento que ello provoca.

Además, los cultivares comerciales son propagados por medio de sus tubérculos debido a que son tetraploides. La introducción de semillas y los métodos clásicos de mejoramiento no pueden aplicarse por la inestabilidad de los caracteres agronómicamente valiosos (Caldiz, 1994, Bajaj, 1987). Debido a ello, el Dr S J Ochatt y colaboradores (1998) iniciaron un plan de mejoramiento basado en el método de selección recurrente *in vitro* y variación somaclonal (descripto anteriormente). La obtención del clon 150, proveniente del cultivar Kennebec, permitió la formulación de las siguientes hipótesis:

- el clon 150 es fenotípica y génicamente diferente al cultivar original
- las plantas y el cultivo de células y tejidos del clon 150 muestran una tolerancia a moderadas concentraciones de ClNa
- el cultivo *in vitro* y la selección recurrente son técnicas válidas para inducir mutaciones e introducirlas en los planes de mejoramientos de ciertos cultivos

OBJETIVOS

Los objetivos para probar las hipótesis planteadas son múltiples y serán descriptos y alcanzados en cada uno de los capítulos de la presente tesis.

CAPÍTULO 1

ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN PLANTA SOMETIDAS AL ESTRÉS SALINO

Los mecanismos utilizados por las glicofitas para tolerar moderadas a elevadas concentraciones de sal han sido estudiados a nivel de planta entera por numerosos investigadores (Pessarakli, 1990). La sal produce una disminución en el crecimiento de las plantas. Los parámetro medidos para hacer un análisis de crecimiento son los indicadores de mecanismos asociados a la sal-tolerancia. Ello se debe a que el crecimiento es la resultante de la división y extensión celular (Salisbury and Ross, 1995). Ambos procesos son diferentes pero funcionan de una manera coordinada. La turgencia es la "fuerza conductora" (driving force) que posibilita la expansión celular. El control de la turgencia y el crecimiento es sin dudas un fenómeno complejo y puede ser modificado a partir de determinados mecanismos que le permitan a la planta sobrevivir bajo un estrés determinado.

La disminución de la tasa de crecimiento relativo (RGR) debida al estrés salino puede, también, atribuirse a los efectos tóxicos de los iones que interfieren en el metabolismo de la absorción de los nutrientes y en el funcionamiento de las enzimas (Kinsbury et al., 1984, Jacoby, 1990).

Análisis de Crecimiento

Un análisis de crecimiento es la medida a intervalos consecutivos de la distribución de los recursos (energía, materia orgánica, agua y minerales) por la planta (Medina, 1977). Para recabar dichos datos se necesitan condiciones controladas de cultivo y resultados homogéneos que indiquen cómo la planta va creciendo a lo largo del tiempo (Medina, 1977). Debido a ello, el análisis de crecimiento se llevó a cabo bajo dos sistemas de cultivo diferentes. El primero se realizó con soporte sólido en macetas. Debido a la dispersión de los datos recabados se realizó un segundo en cultivo hidropónico. En ambos ensayos las plantas crecieron en la misma cámara de cultivo con luz, temperatura y humedad controlada.

Los objetivos del presente ensayo fueron:

♠ determinar el patrón de crecimiento en condiciones fisiológicas normales y en condiciones de estrés salino del clon 150 respecto del cultivar Kennebec

♠ analizar el balance iónico de las plantas de ambos clones en las diferentes condiciones de cultivo

- analizar la importancia de los componentes del RGR para explicar las posibles diferencias entre ambos clones [redacted]
- determinar si el clon 150 es tolerante al estrés salino

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado fueron plantas de *S. tuberosum* de ambos clones (cv. Kennebec como Testigo y 150) provenientes del cultivo *in vitro* mantenidas en la etapa de multiplicación. A partir de las mismas se iniciaron dos ensayos en condiciones de hidroponia, uno de ellos en medio líquido, mientras que el otro se empleó perlita como soporte sólido.

Las plantas provenientes del medio de cultivo estéril deben aclimatarse previamente en condiciones semicontroladas de humedad. Para el cultivo en hidroponia con soporte sólido las plantas fueron trasplantadas en terrinas con una mezcla de turba, perlita y tierra en una relación 1:1:1 (V:V) en una cámara de cultivo. La temperatura en la cámara se mantuvo a 19±1° C, la humedad relativa en 60±10 %. Un registro continuo de la temperatura y la humedad relativa se obtuvo mediante el empleo de un termohidrógrafo. La densidad del flujo de fotones al nivel de las plantas osciló entre 160 y 180 $\mu mol.m^{-2}.seg^{-1}$ de radiación activa en la fotosíntesis, bajo un fotoperíodo de 16 hs. La iluminación fue provista por lámparas Phillips HPLN de 400 watt y lámparas incandescentes de 75 watt.

Pasado el período crítico de rusticación, las plantas fueron trasplantadas a macetas de 800 cm^3 de capacidad con perlita. La perlita fue previamente lavada cinco veces con agua destilada/desmineralizada. Las macetas se regaron diariamente con 50 mL (capacidad de campo) de solución Hoagland reducida al cuarto modificada (Epstein, 1972) reducida al cuarto, pH 6.0. Luego de 2 semanas se inició en este medio el tratamiento salino. Cada 7 días la perlita fue lavada con 1 L de agua desmineralizada y luego con 100 mL de la solución nutritiva más la concentración salina correspondiente. Esto se realizó para evitar la acumulación diferencial de sales en la perlita.

Para el ensayo en condiciones de hidroponia, las plantas provenientes del cultivo *in vitro* fueron aclimatadas en tanques de plástico de 40 L de capacidad conteniendo solución nutritiva arriba señalada. Sobre cada tanque se montó una plancha de plástico, con 60 orificios de 1.7 cm de diámetro. En cada orificio se colocó una cesta, en la cual -sujeta con goma espuma- se introdujo la planta. Para

proporcionar aireación a las raíces, a cada tanque se adosó un sistema de tubos perforados por donde se bombeó aire desde un motocompresor. La condiciones de cultivo empleadas fueron las mismas que en el ensayo anterior.

Pasado el período crítico de aclimatación las plantas fueron transplantadas a macetas de 800 cm^3 de capacidad y la solución contenida en estos recipientes fue aireada con un dispositivo similar al del tanque. El número de orificios, y de plantas, por maceta fue de tres. Luego de 2 semanas se iniciaron los tratamientos salinos.

El diseño experimental en ambos ensayos fue el siguiente: 4 bloques de cada clon, con 12 unidades experimentales por bloque. En el ensayo con soporte sólido cada maceta fue regada con la solución Hoagland reducida al cuarto conteniendo ClNa a las siguientes concentraciones (mM): 0.5, 25, 75 y 150; y en el ensayo en medio líquido: 0.5, 25 y 75. La solución fue renovada cada dos días.

Medición de parámetros de crecimiento

Se realizaron dos cosechas, una inmediatamente antes del inicio del tratamiento salino y otra 28 días después. Después de lavar las raíces con agua desmineralizada, éstas se separaron del vástago determinando el peso fresco de esta fracción. El vástago, a su vez, se subdividió en tallo y hojas, cada una de estas fracciones se pesó por separado. Anteriormente se contabilizó el número de hojas. El área de las mismas fue tomada con un medidor Licor LI-3000. Las fracciones se dejaron por 48 hs. en estufa a 70°C para, luego, estimar los pesos secos de las mismas.

La tasa de crecimiento relativa (RGR) se estimó de acuerdo al método clásico (Sestak et al., 1971) según la siguiente fórmula.

RGR estimado (tasa relativa de crecimiento) = $\{ \ln (w_f) - \ln (w_i) \} \Delta t^{-1}$

donde w_f es el peso seco total al estadio final, w_i al estadio inicial y Δt es intervalo de tiempo entre ambas cosechas.

A efectos de minimizar el error debido a la heterogeneidad inicial de las plantas los datos fueron ordenados por el método de Causton (1991). Este método

también fue utilizado para estimar los otros parámetros derivados del crecimiento, en particular NAR y RAR (ver más abajo).

Los componentes del RGR, NAR y LAR fueron estimados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

NAR (tasa de asimilación neta) = $\{(w_f - w_i)\ (A_f - A_i)^{-1}\}\ \{(\ln(A_f) - \ln(A_i))\ \Delta t^{-1}\}$

donde w_f es el peso seco total al estadio final, w_i al estadio inicial, A_f, área foliar final, A_i, área foliar inicial y Δt es intervalo de tiempo entre ambas cosechas.

LAR(área foliar relativa) = es la proporción de área foliar cuya fotosíntesis mantiene a todo el individuo.

A su vez el LAR puede descomponerse en dos estimadores, el SLA y el LWR, cuyas fórmulas son:

SLA (área foliar específica) = es el cociente entre el área foliar y el peso foliar. Este tiene en cuenta el costo energético para la formación de una unidad fotosintética.

LWR (peso foliar relativo) = es el cociente entre el peso foliar y la biomasa. Este representa la porción asimiladora respecto de todo el individuo; es un estimador más conservativo o menos plástico que el parámetro anterior.

La tasa de acumulación de agua puede ser estimada a partir de la siguiente fórmula:

$RAR_{agua} = \{\ln(PFT - PST)_f - \ln(PFT - PST)_i\}\ \Delta t^{-1}$

donde: PFT, peso fresco total; PST, peso seco total; el subíndice i, significa inicial, el f, final y Δt, el período de tiempo entre las dos cosechas.

Medición de los iones sodio y potasio (Hunt, J, 1982)

Tres plantas de cada clon y de los tratamientos de 0.5 y 75 mM ClNa fueron cosechadas y se registró su peso fresco y seco. Luego fueron transferidas a viales plásticos para proceder a la extracción ácida de los iones libres. Para ello se agregó una solución 0.5 M de ClH. Los viales permanecieron en agitación constante por 72 hs. a 24±1°C. Antes de la medición cada muestra fue diluida con una solución acuosa

de LaCs (0.1 %) en relación 1:10 (P:V). Los cationes Na^+ y K^+ fueron determinados con un espectrofotómetros de absorción atómica (Buck-Scientific, con lámparas para sodio y potasio Westinghouse).

RESULTADOS

Las plantas de ambos clones fueron expuestas a concentraciones crecientes de ClNa en condiciones de hidroponia con soporte sólido para analizar la disminución que ello puede provocar en el crecimiento. El ensayo fue del tipo comparativo con un tratamiento control (0,5 mM ClNa) y otros tres con concentraciones crecientes de ClNa (25 mM, 75 mM y 150 mM ClNa). Sin embargo, la falta de precisión del ensayo solo permitió un análisis parcial de los resultados. El soporte sólido dificultó el muestreo de las raíces y provocó un crecimiento desparejo dentro de cada tratamiento. Los resultados, en general, permitieron visualizar un aumento del peso seco total del clon 150 respecto del clon T en los cuatro tratamientos. El clon T no sobrevivió al tratamiento con 150 mM de ClNa, mientras que el clon 150 lo hizo pero con una disminución marcada del crecimiento respecto del tratamiento control.

Estas diferencias condujeron a realizar un segundo ensayo con plantas cultivadas en condiciones de hidroponia con aireación. Para ello, las plantas fueron expuestas a las siguientes concentraciones de ClNa (mM): 0.5, 25 y 75 durante 28 días. Las tendencias observadas en el primer ensayo pudieron ser corroboradas en el segundo con mayor precisión. Las plantas del clon 150 tuvieron mayor peso fresco total (PFT) y peso seco total (PST) a las tres concentraciones de ClNa estudiadas. Esta diferencia entre ambos clones dificulta el estudio comparativo. Debido a ello, el efecto del ClNa sobre cada variable medida en forma directa fue estimado a través de la reducción porcentual de las mismas respecto del tratamiento control (Tabla 1-1).

El efecto del tratamiento con 25 mM ClNa fue el mismo para ambos clones (Tabla 1). La sal provocó la reducción relativa tanto del PFT, como del PST en igual proporción. Por el contrario, a 75 mM ClNa, la reducción relativa del PFT fue mayor en el clon T (70 %) que en el 150 (12 %). Lo mismo pudo observarse para el PST, donde la reducción relativa también fue mayor en el clon T (56 %) que en el 150 (33 %).

Tanto el PFT como el PST son el resultado de sumar el peso fresco o seco, según corresponda, de cada órgano de la planta (tallo, hojas y raíces). Para cada una

de estas variables fue calculada su reducción porcentual respecto del tratamiento control (Tabla 1-1). Esto permitió analizar qué variables contribuyeron en mayor medida a la diferenciación del PFT o PST entre clones.

Aunque, el peso seco foliar de las plantas del clon 150 mostró una mayor reducción relativa a 25 mM ClNa que las del clon T. Esta diferencia no se tradujo en una reducción relativa del PST a esa concentración de sal (Tabla 1-1). Por otro lado, la reducción relativa del PST de las plantas del clon 150 cultivadas a 75 mM ClNa fue menor que las del clon T debido a una menor reducción relativa de las tres variables intervinientes (Tabla 1-1). La menor reducción relativa del PST de las plantas del clon 150 respecto de las T, a 75 mM de ClNa, se correspondió con una menor reducción relativa del peso seco de la raíz y del tallo; no así de las hojas que fue igual en ambos genotipos (Tabla 1-1).

El PST permite comparar la cantidad de materia seca producida por las plantas en un momento dado. A partir de la medición de esta variable en dos cosechas sucesivas se puede estimar la tasa de crecimiento (RGR) de las plantas en un intervalo de tiempo (28 días para este ensayo). Este estimador de la tasa de producción de materia seca puede ser utilizado para comparar cómo disminuye la producción de materia seca de las plantas de cada clon en un gradiente creciente de salinidad durante 28 días en cultivo.

Las plantas del clon 150 mantuvieron constante el RGR a las concentraciones de ClNa en que fueron cultivadas (0.5, 25 y 75 mM ClNa). Además, el RGR de las plantas del clon 150 fue mayor que el del clon T en los tres tratamientos (Tabla 1-2). Esta diferencia, al igual que antes para el análisis del PFT y PST, dificulta el estudio comparativo entre clones para cada tratamiento. Para salvar esta dificultad fue estimada la reducción relativa del RGR para cada tratamiento respecto del tratamiento control (Tabla 1-2). El tratamiento con 75 mM ClNa provocó una mayor reducción relativa del RGR en las plantas del clon T que en las del clon 150. Esto indica que hay diferencias entre genotipos para la respuesta de crecimiento en condiciones de estrés salino.

Los cambios producidos en el RGR pueden ser atribuidos a cambios en las relaciones entre los diferentes órganos de una planta para la asimilación de materia

seca. La tasa relativa de crecimiento está caracterizada por dos componentes que describen estas relaciones. Uno de ellos describe la eficiencia neta de producción del aparato asimilatorio (NAR). Mientras que el otro componente describe el tamaño relativo del aparato asimilatorio de la planta (LAR).

El NAR, o la tasa de asimilación neta, fue mayor en las plantas del clon 150 respecto de las T a las tres concentraciones de ClNa estudiadas (Tabla 1-2). La reducción relativa del NAR fue menor en las plantas del clon 150 (33 %) que en las del clon T (58 %). Por lo tanto, las diferencias en la reducción relativa del RGR en condiciones de estrés salino, pueden ser atribuidas, al menos en parte, a una menor reducción relativa del NAR en las plantas del clon 150 respecto del clon T.

La reducción relativa del LAR para cada tratamiento respecto del tratamiento control fue calculada, al igual que para el NAR, por los motivos antes reseñados (Tabla 1-2). También como en el NAR, se observó una mayor reducción relativa del LAR en las plantas del clon T respecto del clon 150 a 75 mM ClNa. Por lo cual, este parámetro también estaría contribuyendo a la mayor reducción relativa del RGR de las plantas del clon T respecto del clon 150 a 75 mM ClNa.

El LAR puede descomponerse, a su vez, en otros dos componentes: el SLA y el LWR (Tabla 1-2). El SLA relaciona la superficie potencialmente capaz de fotosintetizar en relación con el peso del área fotosintetizante, mientras que el segundo relaciona el peso de la superficie potencialmente capaz de fotosintetizar en relación con el PST. Para permitir la comparación entre ambos clones fue calculada la reducción relativa de ambos estimadores para cada tratamiento respecto del tratamiento control (Tabla 1-2). La reducción relativa del SLA no varió en forma significativa entre clones para cada tratamiento. Por lo tanto, las diferencias observadas en el LAR pueden ser atribuidas a la mayor disminución relativa del LWR de las plantas del clon T respecto del 150 en el tratamiento con 75 mM ClNa (Tabla 1-2).

El mantenimiento del RGR del clon 150 en condiciones de estrés salino, puede atribuirse, por consiguiente, de modo primario a un aumento relativo del LAR que balancea la disminución relativa del NAR en un gradiente creciente de ClNa agregado en la solución de riego. Para estudiar las bases fisiológicas de estos procesos se

estimó la tasa relativa de absorción de agua (RAR_{agua}, Tabla 1-3). El RAR_{agua} fue mayor en las plantas del clon 150 que en las del clon T para los tres tratamientos aplicados, tanto en términos absolutos como relativos.

El mayor crecimiento del clon 150 respecto del T en altos niveles de suministro de ClNa parece corresponderse con una mayor retención de agua. La retención de agua en condiciones de estrés salino puede resultar de dos fenómenos interrelacionados: 1, una alta acumulación de iones inorgánicos; 2, una alta síntesis y acumulación de compuestos osmocompatibles. En el presente ensayo se evaluó solo la primera posibilidad.

La concentración de Na^+ y K^+ no difirió en forma significativa entre clones, cuando las plantas fueron cultivadas a bajas concentraciones de ClNa (Tabla 1-4). Sin embargo, el tratamiento con 75 mM ClNa provocó un aumento en la concentración de Na^+ de 377 y 146 veces (raíz y vástago, resp.) en el clon T y 56 y 16 veces (raíz y vástago, resp.) en el clon 150 (Tabla 1-4). Además, el aumento fue mayor en las raíces que en el vástago de ambos clones. La concentración de K^+ también aumentó como consecuencia del aumento del ClNa externo en las raíces y el vástago del clon T (Tabla 1-4). La concentración de K^+ solo aumentó en las raíces del clon 150, mientras que la concentración del mismo en el vástago disminuyó respecto del tratamiento control (misma Tabla).

Por lo tanto, la concentración de ambos iones fue mayor en el clon T respecto del clon 150. Luego, el RAR_{agua} fue menor en las plantas del clon T (Tabla 1-3). Por lo tanto, la mayor acumulación de agua en las plantas del clon 150 no puede ser atribuida a una mayor acumulación de otros iones inorgánicos por este clon. Esto sugiere la posibilidad de una acumulación de solutos orgánicos osmocompatibles en este clon. -Trabajos posteriores permitirán afirmar o rechazar esta hipótesis-.

Por otro lado, las diferencias observadas en el comportamiento del RGR entre ambos clones en condiciones de salinidad pueden deberse no solo a efectos sobre las relaciones hídricas de las plantas, sino que también al escape de la toxicidad. En este sentido, el análisis de los datos sugiere que la menor acumulación de Na^+ en el clon 150 podría ser crítica. Por otro lado, se ha avanzado la hipótesis de que la toxicidad del sodio podría deberse, al menos, en parte, a la sustitución del K^+ por el

Na^+ (Cramer et al., 1986). La relación entre la concentración de K^+ y Na^+ disminuyó en forma significativa cuando las plantas de ambos clones fueron cultivadas a 75 mM ClNa (Tabla 1-5). Sin embargo, la concentración de Na^+ respecto del K^+ fue mayor en el clon T que en el 150. Debido a ello, es posible que las plantas del clon T sufrieran un desbalance nutricional más pronunciado que en las plantas del clon 150.

CONCLUSIONES

El análisis de crecimiento fue llevado a cabo con el fin de comparar el patrón crecimiento de las plantas de ambos clones en un gradiente de concentraciones de ClNa. Para ello se probaron dos sistemas de cultivo hidropónico, con y sin soporte sólido. El cultivo de las plantas en medio líquido fue más preciso y los resultados y conclusiones fueron extraídos a partir del mismo. Sin embargo, el primer ensayo (con soporte sólido) marcó tendencias y simplificó el segundo ensayo al ser eliminado el tratamiento 150 mM ClNa.

Cuando se compararon los resultados del análisis de crecimiento entre las plantas de ambos clones se observaron diferencias intraespecíficas en todo el gradiente de ClNa al que fueron cultivadas. Las variables medidas en forma directa, PST, y sus componentes, así como el área foliar, fueron mayores en las plantas del clon 150 que en el clon T en 0.5 mM ClNa. Debido a estas diferencias, en concentraciones de ClNa mayores, las diferentes variables fueron comparadas en términos relativos al tratamiento control. El análisis de los resultados permitió concluir que las plantas del clon 150 exhiben una mayor resistencia a elevadas concentraciones externas de ClNa, tal como lo refleja el mantenimiento de la tasa relativa de crecimiento. La persistencia de diferencias entre el clon T y el clon 150 a lo largo de un gradiente sugiere la existencia de diferencias genéticas más que un fenómeno epigenético.

Los componentes del RGR describieron un comportamiento diferente en uno y otro clon. La tasa de asimilación neta de las plantas del clon 150 disminuyó (en términos relativos) a la vez que aumentó la proporción del área fotosintetizante tal que el RGR se mantuvo constante a lo largo del gradiente de ClNa. Por el contrario, la disminución relativa tanto del NAR no fue balanceada por el aumento del LAR provocando una disminución del RGR en las plantas del clon T cuando éstas sufren estrés salino.

La menor reducción relativa del RGR a concentraciones externas de ClNa elevadas del clon 150, puede ser tanto una consecuencia de la mayor acumulación de agua como una menor acumulación de Na+ en las plantas del clon 150 respecto

de las T. El aumento relativo del RAR_{agua} no puede ser explicado por un aumento de las especies iónicas inorgánicas (Na^+ y K^+) en las plantas del clon 150. En consecuencia, la respuesta a la disminución del potencial osmótico externo de las plantas de este clon debería buscarse en una mayor síntesis de compuestos osmocompatibles. No obstante, no puede descartarse que otros iones inorgánicos no medidos ejerzan un papel en la determinación del potencial osmótico de los tejidos.

Cuando las plantas fueron cultivadas en bajas concentraciones de ClNa, la concentración de Na^+ y K^+ fue la misma en ambos clones. Sin embargo, el aumento del nivel de suministro de ClNa provocó cambios cuantitativos y cualitativos en la composición iónica en los tallos y raíces entre clones. La mayor reducción relativa del RGR en las plantas del clon T puede ser atribuida a dos componentes asociados al nivel de ClNa: 1, el componente osmótico debido al aumento del número de partículas en el medio de cultivo y 2, el efecto tóxico ocasionado por la acumulación y consecuente elevación de la concentración de Na^+ y Cl^- en los tejidos. La mayor acumulación y consecuente elevación de la concentración de Na^+ en las plantas del clon T, que en el clon 150, puede provocar daños en los procesos metabólicos, pérdida de la integridad de las membranas y la reducción en la fotosíntesis, entre otros (Cramer et al., 1985). La retención de K^+ en plantas glicofitas ha sido propuesta como un mecanismo interviniente en la tolerancia al estrés salino. Sin embargo, los datos hasta aquí recabados no parecen concordar, en primera instancia, con esta afirmación. El aumento de K^+ en proporción mayor en el clon T que en el 150, al aumentar el nivel de suministro externo de ClNa, no podría ser invocado como causa de la disminución de los efectos nocivos del Na^+. Altas concentraciones de K^+ son imprescindibles para el correcto funcionamiento celular, ya que mantiene el potencial de turgencia de las células -lo cual favorece el crecimiento- y es cofactor de numerosas enzimas. Sin embargo, la elevada retención y aumento absoluto de la concentración de K^+ no parece ejercer efecto alguno sobre el RGR de las plantas del clon T. Una alternativa es que sea el cociente K^+/Na^+ el que en verdad esté asociado a la tolerancia a la salinidad. Si bien en plantas glicofitas un mayor cociente K^+/Na^+, está asociado a una mayor tolerancia al estrés salino, aquel ha sido asociado a una mayor retención de K^+ lo cual no ocurre en este caso (Munns, 1993). Esto sugiere

que el efecto tóxico del Na^+ sería el mayor responsable de la disminución del RGR en las plantas del clon T

TABLA 1-1: Reducción relativa para las diferentes variables medidas como resultado de la exposición a niveles crecientes de ClNa en plantas del clon T y clon 150 cultivadas en hidroponia. Entre paréntesis es indicado el valor medio de cada cada variable medida en forma directa.

PARAMETRO	ClNa mM	CLON T	CLON 150
PESO FRESCO TOTAL (g)	0	100 ± 0 (8.81 g ± 0.74)	100 ± 0 (16.89 g ± 0.79 [a])
	25	107.2 ± 42.7	81.74 ± 6.6
	75	30.34 ± 6.3	78.7 ± 3.0 *
PESO SECO TOTAL	0	100 ± 0 (0.441 g ± 0.02)	100 ± 0 (0.914 g ± 0.13 [a])
	25	81.66 ± 6.7	72.31 ± 3.76
	75	44.05 ± 4.18	66.99 ± 2.86 *
PESO FRESCO RAIZ (g)	0	100 ± 0 (3.00 g ± 0.54)	100 ± 0 (6.06 g ± 0.86)
	25	72.17 ± 2.66	81.94 ± 5.5
	75	37.01 ± 5.16	77.49 ± 5.1 *
PESO SECO RAIZ (g)	0	100 ± 0 (0.131 g ± 0.02)	100 ± 0 (0.176 g ± 0.02 [a])
	25	81.66 ± 6.79	69.14 ± 3.1
	75	44.05 ± 4.18	63.95 ± 3.2 *
PESO FRESCO TALLO (g)	0	100 ± 0 (2.42 g ± 0.52)	100 ± 0 (3.03 g ± 0.28)
	25	96.51 ± 2.7	95.06 ± 16.3
	75	38.55 ± 7.6	79.27 ± 3.25 *
PESO SECO TALLO (g)	0	100 ± 0 (0.117 g ± 0.02)	100 ± 0 (0.209 g ± 0.03 [a])
	25	74.7 ± 6.0	80.4 ± 4.4
	75	43.9 ± 6.7	63.18 ± 5.33 *
PESO FRESCO FOLIAR (g)	0	100 ± 0 (3.38 g ± 0.59)	100 ± 0 (7.28 g ± 1.08 [a])
	25	72.3 ± 3.2	74.1 ± 3.9
	75	34.4 ± 4.9	79.3 ± 3.5 *
PESO SECO FOLIAR (g)	0	100 ± 0 (0.192 g ± 0.04)	100 ± 0 (0.341 g ± 0.03 [a])
	25	92.5 ± 2.71	70.0 ± 5.1 *
	75	69.9 ± 7.2	69.1 ± 3.2

* $p \leq 0.05$, señala diferencias significativas entre las reducciones porcentuales
a $p \leq 0.05$, señala diferencias significativas entre las variables medidas en forma directa

TABLA 1-2: Reducción relativa del RGR (d^{-1}), NAR (g. cm^{-1}. d^{-1}), LAR ($cm^2 \cdot g^{-1}$), SLA ($cm^2.g^{-1}$) y LWR para cada tratamiento salino respecto del tratamiento control. Entre paréntesis se indica la media de cada uno de los parámetros estimados.

	mM NaCl	CLON T	CLON 150
RGR	0.5	100 ± 0 (0.153 ± 0.001)	100 ± 0 (0.198 ± 0.002 [a])
	25	95.22 ± 2.5	93.22 ± 1.7
	75	77.45 ± 3.7	91.82 ± 1.5 *
NAR	0.5	100 ± 0 (0.015 ± 0.002)	100 ± 0 (0.024 ± 0.002 [a])
	25	81.73 ± 7.4	72.1 ± 3.8
	75	42.57 ± 5.4	66.7 ± 2.8 *
LAR	0.5	100 ± 0 (233.9 ± 55)	100 ± 0 (199.3 ± 8)
	25	202.7 ± 5	229.0 ± 17
	75	187.6 ± 8	233.36 ± 8 *
SLA	0.5	100 ± 0 (806.5 ± 361)	100 ± 0 (407.0 ± 12)
	25	95.6 ± 13.9	119.5 ± 6.9
	75	142.0 ± 29.8	113.6 ± 1.4
LWR	0.5	100 ± 0 (0.409 ± 0.05)	100 ± 0 (0.490 ± 0.01)
	25	110.4 ± 20	96.25 ± 1.9
	75	66.6 ± 7.3	103.28 ± 2.4 *

* p≤0.05, señala diferencias significativas entre las reducciones porcentuales
a p≤0.05, señala diferencias significativas entre las variables medidas en forma directa

TABLA 1-3: Contenido de agua y tasa relativa de acumulación de agua (RAR_{agua}) como resultado de la exposición a niveles crecientes de ClNa en plantas del clon T y clon 150 cultivadas en condiciones de hidroponia.

PARAMETRO	ClNa mM	CLON T	CLON 150
PFT/PST	0.5	21.16 ± 2.49	18.46 ± 0.54
	25	21.62 ± 0.083	20.80 ± 1.14
	75	20.58 ± 1.22	21.79 ± 1.06
RAR_{agua}	0.5	0.085 ± 0.009	0.122 ± 0.003 *
	25	0.079 ± 0.009	0.114 ± 0.006 *
	75	0.055 ± 0.012	0.113 ± 0.005 *

* p ≤ 0.05

TABLA 1-4: Concentración de los iones sodio (Na^+) y potasio (K^+) (mg del ion/g de tejido vegetal) en el vástago y la raíz de las plantas de ambos clones cultivadas a 0.5 y 75 mM ClNa.

	0.5 mM		75 mM	
RAIZ	T	150	T	150
Na^+	0.125	0.24	47.22	13.13
K^+	2.84	2.41	27.57	13.46
VASTAGO				
Na^+	0.247	0.22	36.00	3.5
K^+	3.77	3.60	6.11	2.36

Control H_2O: 0.0024 mg Na^+/L solución
Control ClH: 0.0026 mg Na^+/L solución

TABLA 1-5: Relación K^+:Na^+ en el vástago y la raíz de las plantas de ambos clones cultivadas a 0.5 y 75 mM ClNa.

ClNa	0.5 mM		75 mM	
	T	150	T	150
RAIZ	22.72	10.09	0.58	1.02
VASTAGO	15.26	16.36	0.17	0.67

CAPÍTULO 2

COMPORTAMIENTO A CAMPO DEL CLON 150

Cada cultivar comercial de papa tiene características agronómicas definidas. Las mismas son descriptas en catálogos de los semilleros productores. Estas poblaciones de papa son verdaderos clones, muy estables (genética y fenotipicamente), ya que la producción de los mismos es por medio de los tubérculos. El cultivar Kennebec esta definido en forma cualitativa y cuantitativa a partir de las características de la planta y del tubérculo (ver Tabla 1 de la Introducción).

El clon 150, como fue probado en ensayo previos, tiene un acervo genético diferente al cultivar de origen. Por lo tanto, es de esperar que las características agronómicas descriptas para el cultivar Kennebec sean diferentes respectos de las del clon 150. Debido a ello, el objetivo del presente ensayo fue estudiar y comparar a campo las características morfológicas y fisiológicas del clon 150 respecto del clon T.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de ambos clones (T y 150) provenientes del cultivo *in vitro* fueron aclimatadas en un invernáculo. Para ello se dispusieron terrinas con una mezcla de turba, perlita y tierra (V:V:V) y un túnel de plástico para evitar la desecación de las plantas. Durante los 3 primeros días fueron regadas por aspersión constante. Luego, las cámaras fueron abriéndose paulatinamente hasta el día 28 (desde la aclimatación) cuando se dejaron destapadas completamente.

Pasado el período crítico de aclimatación, las plantas fueron transportadas hasta la Estación Experimental "Ing. Agr. Julio Hirschhorn", ubicada en el barrio de Los Hornos, dependiente de la Facultad de Cs. Agrarias y Forestales de La Plata. La ubicación geográfica es 34°55' de latitud Sur, 57°57'de longitud Oeste y una altura de 15 msnm, con una temperatura media de verano de 22°C y una amplitud térmica de 12°C. La precipitación anual alcanza 1050 mm.

El ensayo se realizó desde el 24 de Octubre de 1996 al 31 de Enero de 1997. El diseño experimental consistió en 6 surcos de 18 m de largo con un número variable de plantas por surco. Del clon 150 se plantaron 172 plantas y se realizó un borde con minitubérculos. Del clon T se plantaron 177 y se realizó el mismo borde. El diseño experimental consistió en bloques; cada bloque de 1 m lineal contenía 3 plantas a 30 cm de distancia entre ellas.

A las 3 semanas de la plantación se realizó el control de malezas por medio de la aplicación de *Metribuzin* (1 L/Ha) y completado con labores manuales. Para el control fitosanirario se suministró *Temik* (10 kg/Ha). A partir del 2/1/97 se aplicó *Mancozeb* (0,8 kg/Ha) en forma semanal.

El sistema de riego empleado fue por goteo. Este fue suspendido el 5 de Enero por la rotura de la bomba de suministro de agua.

Se realizó una cosecha el 2 de Enero en la cual se extrajeron 3 bloques de plantas de cada clon. Los datos extraídos fueron: peso fresco y seco de vástago, raíz y estolones, número de hojas y área foliar, número de tallos principales y secundarios, y número y peso de los tubérculos.

A los 90 días se evaluó el vigor de las plantas, el aspecto agronómico y el aspecto sanitario (presencia de tizón tardío de la papa).

La cobertura foliar fue medida periódicamente, basado en la metodología descripta por el C.I.P. (Circular C.I.P., 1986).

El 27 de Enero se aplicó un defoliante para la destrucción del follaje de las plantas (*Grammoxone*, 1 L/ha). Para esa fecha, el 50 % del clon T se había entregado. El 28/1 se realizó la cosecha manual de los tubérculos. En la misma se contabilizó el peso fresco total de los tubérculos por planta. Además se extrajeron 10 muestras de cada clon para estimar el número y peso individual de los tubérculos, discriminados según su tamaño. También fue evaluado: el aspecto morfológico, color de pulpa y piel, forma del tubérculo, profundidad de los "ojos", malformaciones y aspecto sanitario. El patrón seleccionado para la evaluación de las características descriptas fue "El Catálogo Holandés de Variedades de Papa" (1994).

Con una muestra de 10 tubérculos de 10 cm de diámetro aprox. se determinó el porcentaje de materia seca, según la metodología descripta por .

Los tubérculos fueron almacenados en una cámara ISCO a 6±1 °C con un flujo de aire interno constante. Para realizar un estudio sobre la senescencia de los tubérculos durante el almacenaje se tomaron cincuenta tubérculos de ambos clones. Los mismos fueron elegidos según su tamaño (10 cm de diámetro), sanos, sin síntomas de enfermedades o malformaciones. Se registró el número de brotes por tubérculo y el número de tubérculos brotados a los 90, 110, 124, 150 y 164 días post-cosecha.

Para evaluar los parámetros fisiológicos de los tubérculos se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con 5 repeticiones de 10 tubérculos cada una y de cada clon. Los mismos fueron colocados en bandejas con vermiculita húmeda. Las mismas se dispusieron en una cámara de cultivo a 17±1°C en completa oscuridad. Periódicamente fue registrado el número de tubérculos brotados para estimar el período de dormición absoluta. Este dato se expresó como días después de la defoliación del cultivo. Luego de la brotación se estimó el período de incubación de los brotes para formar los nuevos tubérculos (brotación-tuberización sobre los brotes). Este parámetro es un indicador de la edad fisiológica de los tubérculos. El mismo se expresa en días desde la brotación hasta la formación de nuevos tubérculos (Caldiz, 1990).

Los resultados fueron analizados por ANOVA o por un test no paramétrico (Kruskal-Wallis) en los casos en que no se cumplió la homogeneidad de las varianzas. La homogeneidad de las varianzas fue corroborada por el test de Bartlett. El test de comparaciones múltiples utilizado fue el de Tukey. El análisis numérico fue realizado utilizando el programa STATGRAPHICS (Statistical Graph Corp., 1992).

RESULTADOS

Las plantas de ambos clones se aclimataron sin observarse pérdidas luego del pasaje del invernáculo al campo o por efecto del transporte.

Durante las dos últimas semanas de Diciembre el clon T floreció. Por el contrario, el clon 150 floreció dos semanas más tarde, cuando en el clon T ya no se encontraban flores (ver Fig. 1 Introducción). El color de las mismas fue lila, diferente al color blanco de las flores del clon T. Estas últimas coincidieron con la descripción publicadas para este cultivar (ver introducción).

Después de 12 semanas (2 de Enero) se realizó la primera cosecha (Fig. 2-2). El vigor de las plantas de ambos clones fue el mismo, mientras que el aspecto agronómico fue mejor en el clon T (Tabla 2-1). En cambio, el aspecto sanitario dio como resultado diferente resistencia del clon 150 respecto del T al ataque de *Alternaria solanii*.

El peso fresco del tallo y las hojas fueron similares entre ambos clones (Tabla 2-2). Sin embargo, la arquitectura de las plantas del clon 150 fue diferente. Las mismas tuvieron mayor número de hojas y tallos principales y secundarios (misma tabla). La cobertura foliar hasta esta primer etapa fue mayor para el clon T (Fig. 2-3). Sin embargo, al momento de la cosecha ambos clones tuvieron un 100 % de cobertura foliar (misma tabla). El LWR fue mayor en el clon T respecto del 150 (misma Tabla).

El número de tubérculos cosechados por planta fue mayor en el clon 150 (Tabla 2-3). Los tubérculos fueron clasificados por su tamaño. Al analizar el número de los mismos por planta en las distintas fracciones se observó una relación inversamente proporcional entre ambos clones. La tendencia de ambos clones fue la misma, un menor número de tubérculos en las fracciones más grandes. Sin embargo, las plantas del clon 150 tuvieron un número mayor de tubérculos en la fracción menor y este parámetro decreció hacia las fracciones más grandes (misma tabla).

El peso de los tubérculos fue más variable que el número y fue mayor en el clon T (Tabla 2-4). Cuando se analizaron las fracciones 1 y 2 del clon T se

observaron los tubérculos con mayor peso, mientras que el clon 150 los tuvo en la fracción 2 (misma tabla).

La cobertura foliar creció hasta el 100 % en 78 días desde el transplante (Fig. 2-3). Ambos clones cubrieron el suelo en igual período de tiempo. Sin embargo, la pendiente entre ambos fue diferente (misma fig.). Desde los 78 días hasta la cosecha final las plantas de ambos clones fueron perdiendo el follaje. En la figura se puede observar que esta pérdida fue más lenta en el clon 150 que en el T. A los 113 días desde el transplante (y 7 días antes de la cosecha final) la cobertura foliar del clon 150 fue del 73,6 %. En cambio, la cobertura alcanzada por el clon T fue del 61,9 % (misma fig.).

La cosecha final se realizó cuando la cobertura del suelo del clon T llegó al 60%. La fecha prevista para esta cosecha era fines de febrero a principios de marzo. Sin embargo, los problemas suscitados con la bomba que suministraba agua a la estación experimental adelantó la fecha de cosecha. Además, el aspecto fitosanitario de las plantas del clon T comenzaba a decaer por el ataque del tizón tardío de la papa.

El color y la piel de los tubérculos del clon 150 fue diferente a las del T. Mientras que las del T siguieron las características descriptas para el cultivar Kennebec, las del 150 fueron de color rosado. La forma de los tubérculos fue en ambos clones la misma (oval). El clon T siguió el patrón previsto para el cultivar Kennebec, con ojos más superficiales. En cambio, la profundidad de los ojos del 150 fue mayor (datos no mostrados).

El tamaño de los tubérculos del clon T fue 3 veces mayor respecto del 150 (Tabla 2-5). Por el contrario, el mayor número de tubérculos por planta lo tuvo el clon 150 (misma tabla). Es de destacar la diferencia observada en el número de tubérculos menores a 4 cm de longitud (36,5 en el clon T y 124,70 en el 150). Ello podría indicar un retraso en el tiempo de entrega de las plantas del clon 150 respecto de las T.

Parámetros fisiológicos: la duración del período de dormición absoluto de los tubérculos fue diferente entre clones (Tabla 2-6). El clon 150 tuvo un período 21 días

menor respecto del clon T. La edad fisiológica, medida por la duración del período de incubación de los tubérculos, también fue diferente entre clones. La diferencia entre ambos clones fue de 31 días, siendo mayor para el clon 150 (misma tabla).

Las figuras 2-4 y 2-5 muestran la distribución de ambos parámetros a lo largo del tiempo. El clon 150 rompió la dormición en el término de 50 días (desde que brotó el primer tubérculo hasta el 100% de tubérculos brotados). Por el contrario, el período de ruptura de la dormición del clon T fue más amplio (110 días, Fig. 2-4B).

El período de incubación no siguió una distribución normal (Fig. 2-5A). Ambos clones presentaron 2 picos de tuberización con más de 100 días de diferencia. Sin embargo, se puede observar que el clon T tuberiza en un período más corto que el clon 150 (Fig. 2-5B). El clon 150 alcanza el 100 % de tuberización 140 días más tarde que el clon T (misma figura).

Los tubérculos cosechados al 28/1/97 fueron almacenados en una cámara de cultivo a temperatura baja y con una corriente continua de aire para controlar la brotación. Durante los 5 primeros meses (150 días, aprox.) la dormición de los tubérculos del clon 150 fue disminuyendo, tal que, al término de ese período el 50 % de los tubérculos habían brotado (Fig. 2-4 y 2-5). El clon T comenzó la ruptura de la dormición prematuramente, pues el mismo porcentaje de brotación se alcanzó a los 90 días (mismas figuras). Sin embargo, ambos clones alcanzaron el 100 % de brotación al final del período en estudio sin observarse diferencias significativas entre ellos (misma fig.).

El porcentaje de materia seca fue de 17,8 % para el clon T y 16,7 % para el 150. El valor promedio histórico para el cultivar Kennebec en el sudeste de la Prov. de Buenos Aires es de 18,8 % (Cacace et al., 1992).

CONCLUSIONES

La conclusiones del presente ensayo son preliminares. Ello se debe a que no hay repeticiones del mismo en el tiempo y por los problemas suscitados con el riego. Sin embargo, tanto las características fenotípicas como las fisiológicas evaluadas, son de importancia y aportan nuevas pruebas a la diferenciación de ambos clones.

Los resultados hallados coinciden con las observaciones de ensayos anteriores realizados en cámaras de cultivo o invernáculo (Marconi et al., 1992). La relación inversamente proporcional entre el tamaño y el número de tubérculos entre ambos clones, y la coloración de la piel y pulpa de los tubérculos del clon 150, se mantuvo luego del crecimiento en el campo.

Los valores de peso fresco del tallo principal y el número de tallos por planta fueron mayores en el clon 150. Los tallos son las bases donde se originan los estolones, los cuales darán origen a los tubérculos. El mayor número de tubérculos por planta podría explicarse a partir de una mayor partición de biomasa hacia los tallos y la mayor proliferación de estolones por tallo.

Las mismas características de color rosado de la piel y la pulpa de los tubérculos del clon 150, observadas en trabajos previos, se mantuvieron en el presente ensayo (Marconi et al., 1992).

La relación inversamente proporcional observada en el clon T entre tamaño y número de tubérculos por planta no se observó en el clon 150. Esto ya había sido descripto en trabajos previos, donde el tamaño del tubérculo del clon 150 era menor aunque su peso no fue significativamente diferente al T (Marconi et al., 1992).

Las diferencias observadas en los parámetros fisiológicos aportan pruebas para la diferenciación genética entre ambos clones. El período de dormición de los tubérculos es un parámetro que está genéticamente determinado, aunque puede ser modificado por las condiciones ambientales (Caldiz, 1994). El período de incubación también fue diferente entre clones. Este parámetro está relacionado con el posterior rinde del cultivo (Caldiz, 1990). Caldiz et al. (1988) observó que el corto período de incubación de la variedad Sureña INTA la hacía más sensible a reducciones en el

rendimiento. Esto obliga al productor a mantener los tubérculos recién cosechados en cámaras a bajas temperaturas para mantener su potencial de rendimiento. Los 21 días de diferencia en el período de incubación entre clones podría determinar la forma de almacenamiento de los tubérculos cosechados a campo.

Las diferencias encontradas en el mayor número de tubérculos en las fracciones de menor tamaño, el mayor período de incubación de las plantas y la mayor cobertura foliar al momento de aplicar el defoliante del clon 150 podrían deberse a que el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de este clon se halla desfasado en, al menos, 30 días respecto del clon T. Esta hipótesis también se basa en el desfasaje que se observó al momento de la floración y el peso de los tubérculos de las fracciones de mayor y menor tamaño.

El tamaño de los tubérculos y la posible falta de crecimiento hasta su maduración total pueden ser los causantes de la disminución del contenido de materia seca de los mismos en el clon 150. Cabe destacar que la industria argentina recibe papa con un mínimo de 18 % de materia seca (Caldiz, comunicación personal). Sin embargo, el límite de aceptación bajó del 18% al 17,5 % por las condiciones del campo en el presente año (fuente Clarín Rural, 26/4/97). La falta de riego en los días finales del cultivo y la condiciones ambientales del período en estudio pueden haber contribuido a disminuir el porcentaje de materia seca en los tubérculos de ambos clones.

TABLA 2-1: Características del cultivo a campo a los 90 días de la plantación.

Variable	clon T	clon 150
Vigor de la planta	9	9
Aspecto agronómico	9	7
Aspecto sanitario*	3	8

* solo referido a la presencia de *Alternaria solanii* (tizón temprano de la papa)
Según parámetros tomados con el especialista Ing. Agr. Daniel Caldiz.

TABLA 2-2: Resultados hallados en la cosecha realizada el 2/1/97. PF T, peso fresco tallo; PF H, peso fresco hojas; N° H, número de hojas; N° T pr., número de tallos principales; N° T sec., número tallos secundarios; LWR, peso foliar relativo.

CLON	PF T (g)	PF H (g)	N° H	N° T pr.	N° T sec.	LWR
T	134.69	257.20	149.69 *	1.78 **	8.44	0.656 **
150	181.94	196.10	250.30	2.33	9.61	0.518

*Kruskal-Wallis, p=0.023
**ANOVA, p<0.05

TABLA 2-3: Número de tubérculos cosechados el 2/1/97. Se indica el número para cada fracción de tamaño y el total de tubérculos cosechados por planta en promedio. 1, menores de 3 cm de largo; 2, entre 5 y 3 cm; 3, entre 7 y 5 cm; 4 mayores de 7 cm.

Fracción	1	2	3	4	TOTAL
CLON T	3.00	3.00	2.00	1.44	9.44 *
CLON 150	9.11	4.56	3.00	0.56	17.22

*ANOVA, p<0.05

TABLA 2-4: Peso fresco de los tubérculos cosechados el 2/1/97 de los dos clones (**T** y 150) de papa. Se indica el peso en gramos para cada fracción de tamaño y el peso fresco total de tubérculos cosechados por planta en promedio. 1, menores de 3 cm de largo; 2, entre 5 y 3 cm; 3, entre 7 y 5 cm; 4 mayores de 7 cm.

Fracción	1	2	3	4	TOTAL
CLON T	13.81	68.38	113.36	117.31	313.87 *
CLON 150	24.83	45.91	63.05	23.11	156.91

*Kruskal-Wallis, p=0.023

TABLA 2-5: Resultados obtenidos al 28/1/97 para el número, peso fresco y tamaño de los tubérculos. N° Tub.(1), número de tubérculos menores a 4 cm; N° Tub.(2), número de tubérculos mayores a 4 cm; P F Tub, peso fresco de los tubérculos.

	N° Tub.(1)	N° Tub. (2)	P F Tub. (g)	TAMAÑO (cm)
CLON T	36.5 *	21	1.70	4.51 *
CLON 150	124.70	24	1.57	1.51

*ANOVA, $p<0.05$

TABLA 2-6: Estimación del período de dormición y edad fisiológica de los tubérculos cosechados el 28/1/97, expresado en días.

	PERÍODO DORMICIÓN	EDAD FISIOLÓGICA
CLON T	76.09 ± 4.09 *	148.32 ± 8.02
CLON 150	55.48 ± 2.65	179.68 ± 15.15 ♦

* ANOVA, $p<0.05$

♦ Kruskal-Wallis, $p<0.10$

FIGURA 2-1: Plantas del clon T y 150 cosechadas el 2 de enero de 1997.

FIGURA 2-2: Corte transversal de los tubérculos de ambos clones.

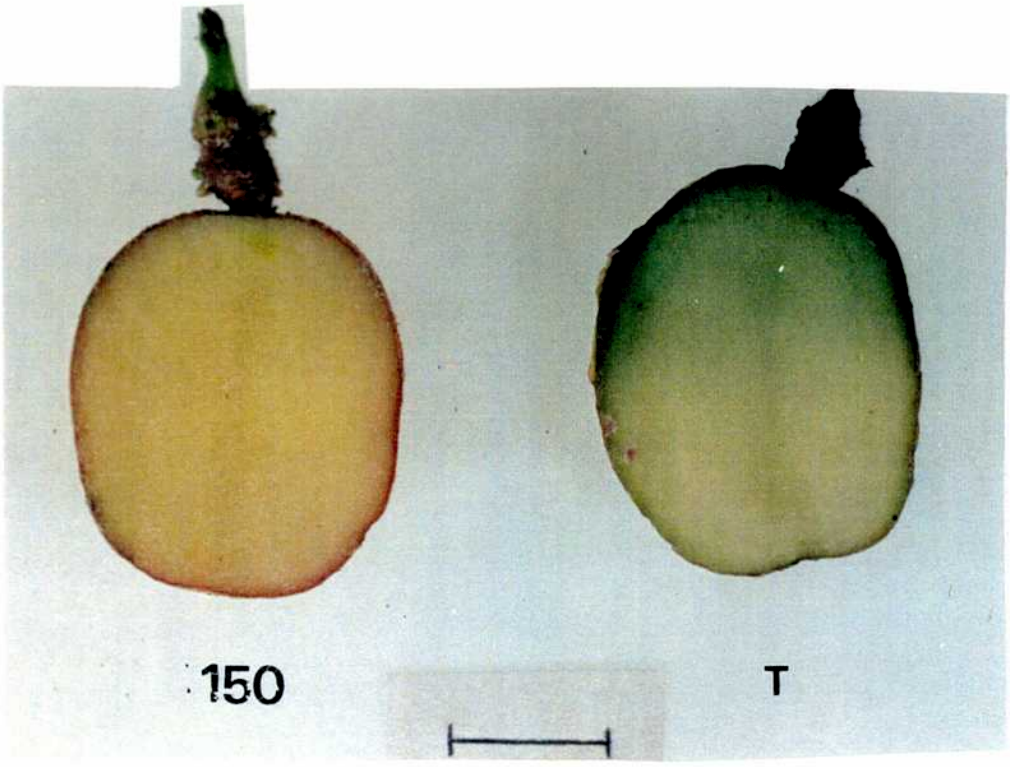


FIGURA 2-3: Capacidad de cobertura foliar de ambos clones a lo largo del período de cultivo, medida como porcentaje.

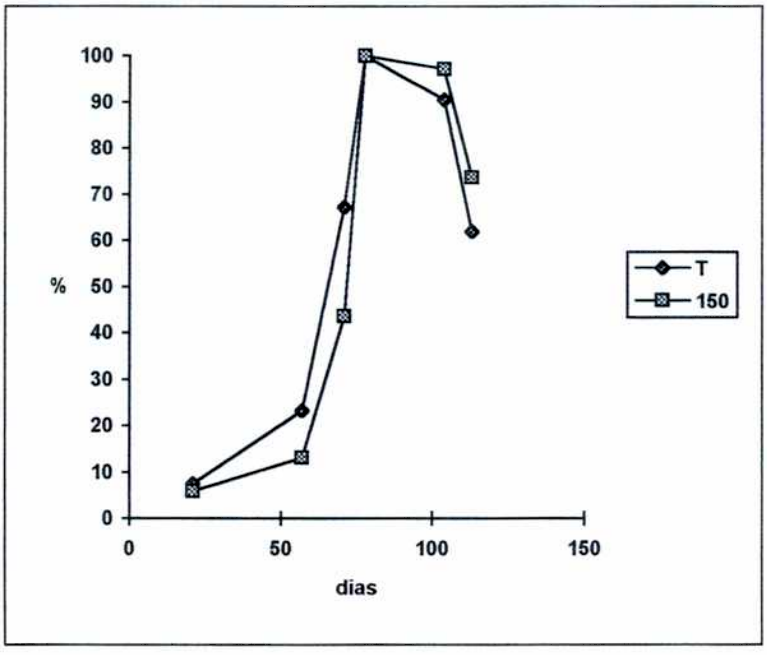
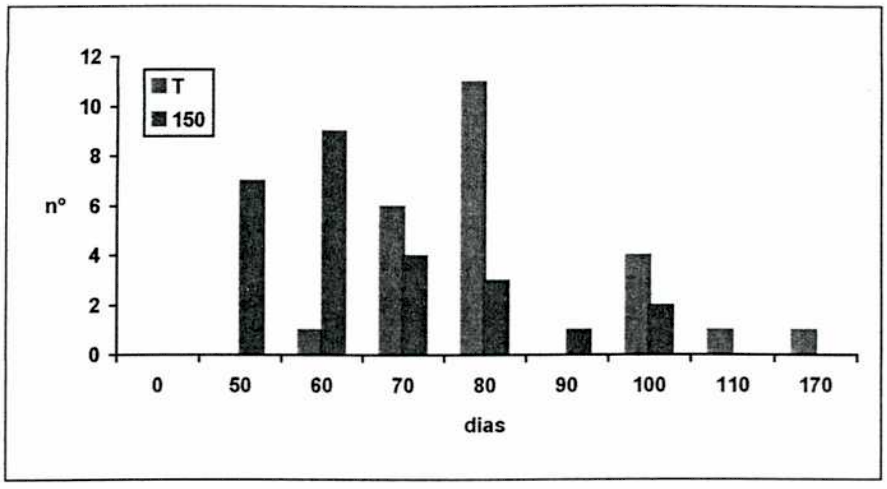


FIGURA 2-4: Tabla de frecuencias y frecuencias acumulados del período de dormición de los tubérculos cosechados el 28/1/97 y mantenidos en cámara de cultivo a 17°C (ver materiales y métodos).



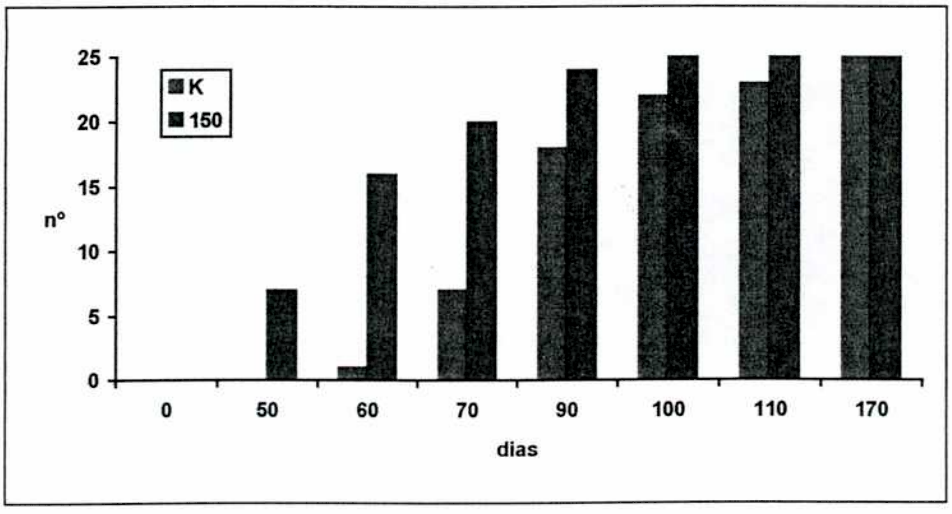
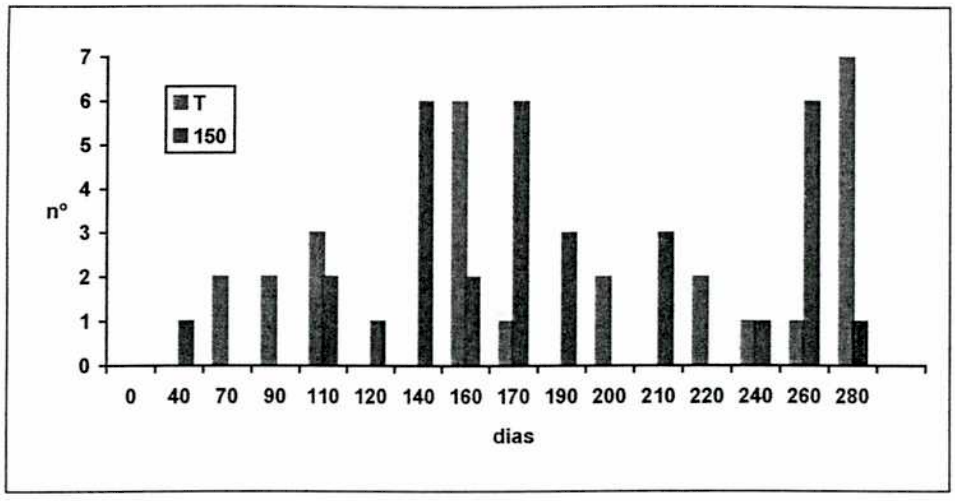


FIGURA 2-5: Tabla de frecuencias y frecuencias acumulados del período de incubación de los tubérculos cosechados el 28/1/97 y mantenidos en cámara de cultivo a 17°C (ver materiales y métodos).



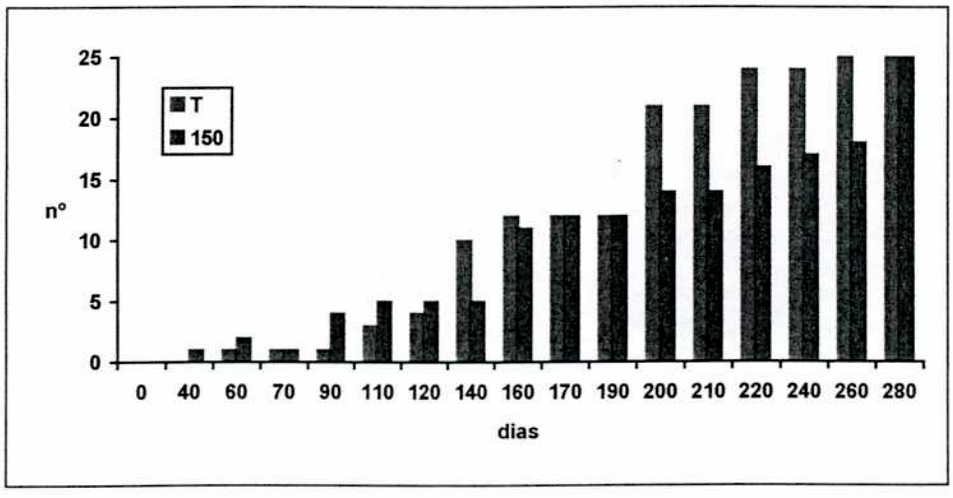


FIGURA 2-6: Número de tubérculos brotados durante el período de almacenaje en cámara de cultivo a 4°C, medido en porcentaje.

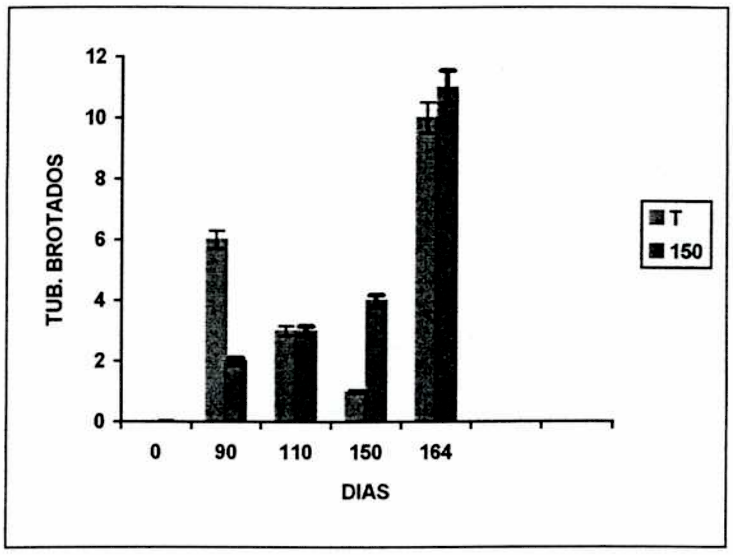
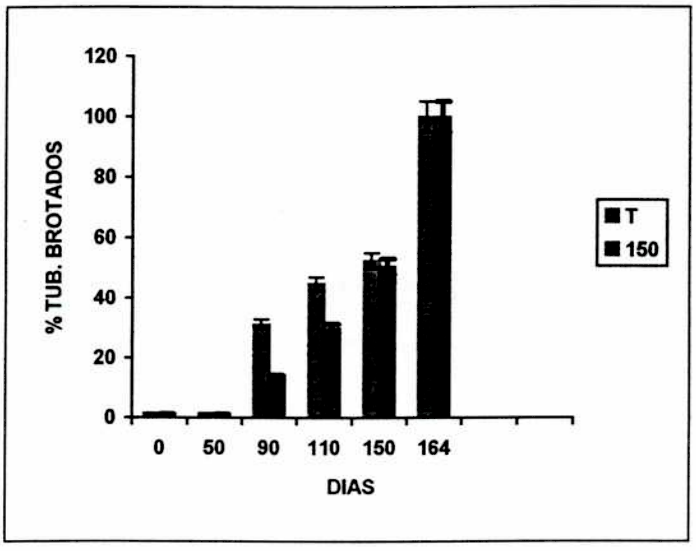


FIGURA 2-7: Número de tubérculos brotados durante el período de almacenamiento, medido como porcentaje acumulado.



CAPÍTULO 3

ESTRÉS OXIDATIVO COMO CONSECUENCIA DEL ESTRÉS SALINO

Bohnert y col. (1995) han sugerido que numerosas especies vegetales responden en una forma similar a diferentes condiciones xenobióticas. Todos estos disturbios; tales como la sequía, temperaturas extremas, salinidad, entre otras; provocan una disminución en el potencial agua de la planta. Este síntoma se ha observado durante la primera fase de crecimiento de plantas sometidas a un estrés salino. Munns y col. (Munns, 1993, Munns et al., 1997) han observado que la curva de crecimiento de plantas de trigo y cebada tolerantes a la sal es bifásica. En una primera fase, la sal origina una disminución en la tasa de crecimiento debido al estrés osmótico que se genera por el ClNa del medio. Luego, la segunda caída de la tasa de crecimiento se debe al efecto tóxico de los iones sobre la planta.

La sal disminuye el crecimiento de las glicofitas debido a que afecta el metabolismo celular, provoca daño a nivel intracelular y altera los procesos fisiológicos. Numerosos trabajos sugieren y relacionan la generación de un estrés oxidativo como consecuencia de exponer las plantas a medios con altos contenidos de ClNa (ver Corpas et al., 1993, Gossett et al., 1996, Piqueras et al., 1996).

Esto puede deberse a la toxicidad de las especies parcialmente reducidas del oxígeno, como los radicales $O_2^{\bullet-}$ (anión superóxido), $HO^{\bullet}$ (hidroxilo) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), las cuales son inducidas a partir del ClNa del medio del cultivo (Fig. 1) (Corpas et al., 1993, Mishra et al., 1993, Del Longo et al., 1993, Gossett et al., 1994, Olmos et al., 1994). Hernandez et al. (1993) ha demostrado que el ClNa induce la formación de los radicales peróxido de hidrógeno y anión superóxido en hojas de *Pisum sativum*.

El anión superóxido puede ser generado tanto por reducción del O_2 como por oxidación del H_2O_2. El mismo puede provenir de algunas reacciones enzimáticas, como por ejemplo, por la acción de las flavoproteín deshidrogenasas, xantino oxidasas, triptofano oxidasas, diamino oxidasas, entre otras. O por procesos no enzimáticos, como producto de algunas reacciones redox celulares, como la autoxidación de moléculas biológicas (ferredoxina; hidroquinonas; tioles). La toxicidad de este anión se evidencia por su capacidad de oxidar directamente polifenoles, catecolaminas, tocoferoles, leucoflavinas, ascorbato, enedioles y tioles, también puede inactivar enzimas como catalasas y peroxidasas (Ahmad, 1995). El estrés

salino provoca un aumento de este radical libre en los cloroplastos y mitocondrias. En numerosos trabajos con plantas de cultivares o clones tolerantes a la sal se observó un aumento de las enzimas ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa. Por el contrario, los clones sensibles mostraron un incremento del $O_2^{\bullet-}$ y una disminución de la actividad de las enzimas antes citadas (Corpas et al., 1993, Gossett et al., 1996).

El peróxido de hidrógeno puede ser generado a partir del anión superóxido por la superóxido dismutasa, el cual se produce en el fotosistema I por reducción del oxígeno molecular. También puede producirse por la fotorrespiración a partir de la acción de la glicolato oxidasa en los glioxisomas. La principal característica de este compuesto es su capacidad de atravesar las membranas. El daño que provoca en altas concentraciones, es la inhibición de la fijación del CO_2 y, a nivel metabólico, algunas enzimas del ciclo de Calvin dentro de los cloroplastos.

El $OH^{\bullet}$ es la especie del oxígeno más reactiva y más potente que el $O_2^{\bullet-}$ El mismo puede reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, carbohidratos, ADN y ARN (Davies, 1995).

El oxígeno singulete reacciona con compuestos eno o dienos y con aquellos que poseen en su estructura grupos funcionales ricos en electrones. También produce la oxidación de grupos sulfuros a sulfóxidos y la fotoxidación de fenoles (Davies, 1995). Las membranas tilacoidales son, particularmente sensibles al $^1O_2$, induciéndose la peroxidación lipídica en los ácidos grasos que componen los glicolípidos, fosfolípidos y sulfolípidos del tilacoide.

Peroxidación lipídica

Los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares son fácilmente oxidables enzimáticamente o por peroxidación autoxidativa mediante una reacción en cadena. La peroxidación lipídica es el deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados y esencialmente involucra tres etapas diferentes que incluyen la de iniciación, propagación y terminación (Chen et al., 1995, Gallego, 1997). La medición de la peroxidación lipídica da idea del daño producido en las membranas por acción de las especies reactivas del oxígeno.

Otra metodología empleada para determinar la integridad de las membranas celulares es la medición de la conductividad eléctrica. Los daños producidos pueden ser medidos en forma indirecta a partir de la conductividad eléctrica registrada por el aumento de solutos en soluciones acuosas. Esta metodología ha sido empleada en numerosos trabajo para determinar la integridad de las membranas a ciertos solutos, como son el sodio y el potasio entre otros (Bouma and De Visser, 1993, Taleisnik and Grunberg, 1994).

DEFENSA ANTIOXIDANTE

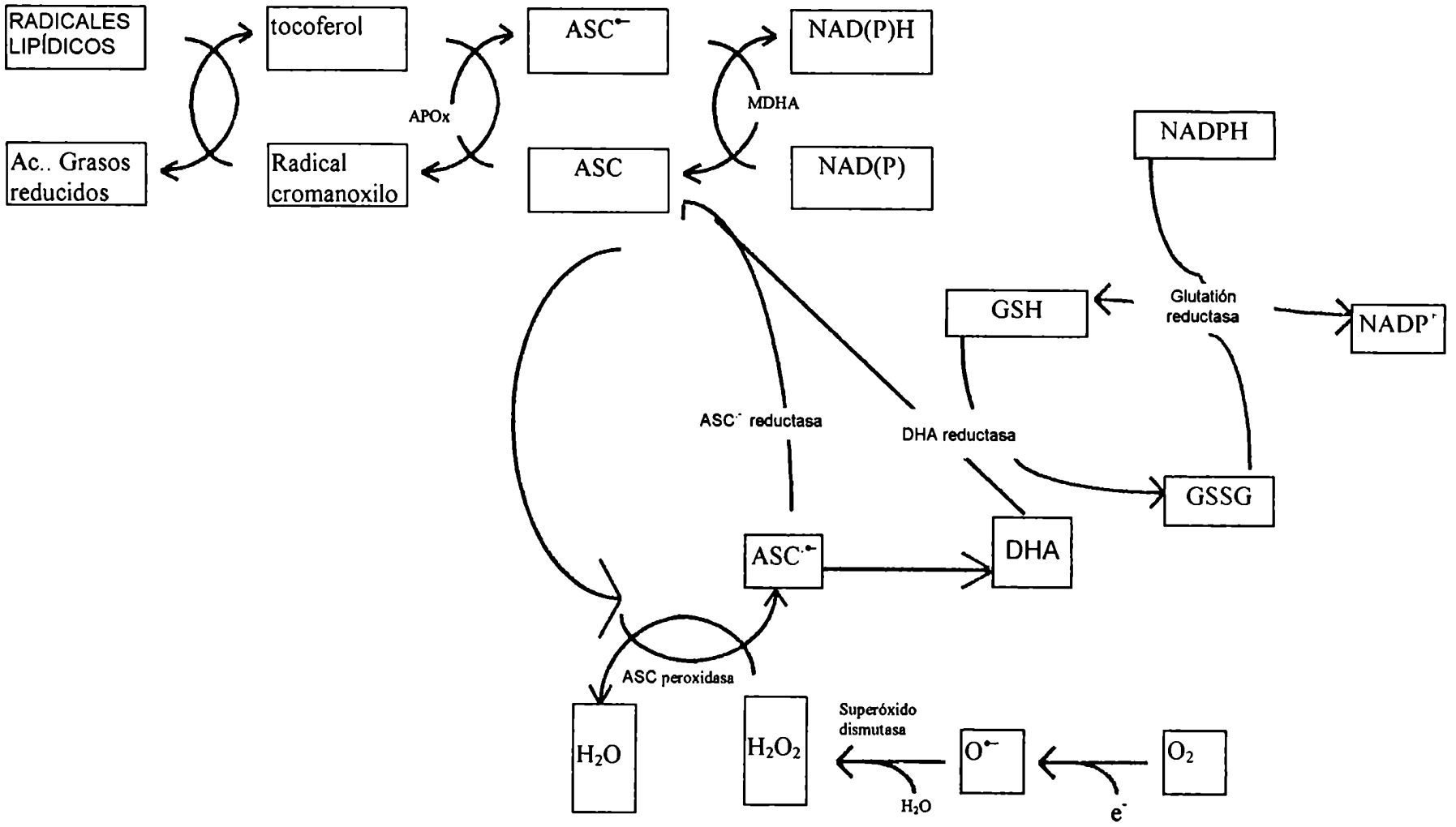
Tanto las células, los órganos como la planta en conjunto, poseen mecanismos que se encargan de protegerlas contra el daño oxidativo. La primera línea de defensa involucra moléculas de bajo peso molecular (antioxidantes) que pueden actuar como preventivos mediante diferentes mecanismos (como glutatión, ácido ascórbico u otros) (Ahmad, 1995).

El ascorbato y el glutatión son dos compuestos claves para la defensa antioxidante. El ascorbato se encuentra en los cloroplastos. Este puede reducir el H_2O_2 a agua. El glutatión permite la regeneración del ascorbato por la reducción del dehidroascorbato (Fig. 3-1).

La segunda línea de defensa está constituida por enzimas. En primer lugar se ubica la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1), la cual dismuta el $O_2^{\bullet-}$ en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Esta enzima fue clasificada en tres diferentes tipos, de acuerdo al cofactor: CuZnSOD, MnSOD y FeSOD (Dalton, 1995). La primera se encuentra en el citosol y la segunda en la matriz mitocondrial. Tanto FeSOD, como CuZnSOD pueden estar en el estroma del cloroplasto.

La catalasa (EC 1.11.1.16) se localiza en los peroxisomas y glioxisomas de las células. La afinidad por su sustrato (H_2O_2) es baja (alta Km). Sin embargo, es un eficiente depurador o atrapante (*scavenger*) que no requiere una fuente adicional de poder reductor (Dalton, 1995). El peróxido de hidrógeno es convertido a agua y oxígeno (Olmos et al., 1994).

Figura 3-1: Posibles rutas metabólicas antioxidantes durante el período de crecimiento de las plantas sometidas a un estrés salino.



En las células puede ocurrir una detoxificación del H_2O_2 por peroxidasas inespecíficas que utilizan una variedad de donadores de electrones (compuestos fenólicos, glutatión, NAD(P)H, Hernandez et al., 1993, 1995).

La ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) es una peroxidasa específica que utiliza ascorbato como donor directo de electrones generando el radical libre monodehidroascorbato. El mismo puede ser reducido por medio de una reacción enzimática o puede dismutar espontáneamente para dar ascorbato y dehidroascorbato (Fig. 3-1). Esta enzima es abundante en el cloroplasto y, también puede hallarse en el citosol.

Glutatión reductasa (E.C. 1.6.4.2) es una de las enzimas más estudiadas en el ciclo ascorbato-glutatión (Fig. 3-1). La misma cataliza la reacción:

$$2\ GSH + DHA \longrightarrow GSSG + \text{ascorbato}$$

Donde la oxidación del glutatión permite cerrar el ciclo. Se localiza en el cloroplasto, y en menor cantidad en el citosol y mitocondrias. Cuando los cloroplastos son iluminados, el pH del estroma aumenta favoreciéndose la reacción. La presencia de la enzima DHR facilita el proceso (Dalton, 1995).

Por lo tanto, bajo condiciones extremas de estrés las plantas adaptan su metabolismo y varían su modelo de desarrollo. Los patrones de expresión génica se modifican y toda la planta altera su funcionamiento para poder sobrevivir en dichas condiciones. Estos mecanismos de activación pueden diferir entre plantas sensibles y tolerantes (Bohnert et al., 1995). Además, la sensibilidad y rapidez de la respuesta al estrés puede también diferenciar ambos tipos de plantas.

Los objetivos de este ensayo fueron:

♠ determinar si existe una relación (medida en forma indirecta) entre el aumento de especies reactivas del oxígeno y el estrés salino

♠ comparar la respuesta al estrés generado entre ambos clones en estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de ambos clones (T y 150) provenientes del cultivo *in vitro* fueron rusticadas en contenedores de 40 L de capacidad con solución nutritiva Hoagland (Hoagland and Arnon, 1957) a pH 6.0, según la técnica descripta en el capítulo anterior sobre el cultivo hidropónico. La cámara de cultivo se mantuvo en las condiciones descriptas en los ensayos anteriores. Una vez aclimatadas, con un porte que les permitiera seguir creciendo sobre un soporte sólido se las transplantó. Las macetas de 800 cm^3 de capacidad con perlita fueron regadas diariamente con solución nutritiva Hoagland (Hoagland and Arnon, 1957). Luego de 2 semanas se inició en este medio el tratamiento salino. La perlita fue previamente lavada con agua destilada/desmineralizada. Las plantas continuaron con un riego diario de 50 mL (capacidad de campo) de solución nutritiva reducida al cuarto (Epstein, 1972).

El diseño experimental consistió en 4 bloques con 6 repeticiones cada uno para iniciar los tratamientos salinos. Cada uno de ellos fue regado con una concentración diferente de cloruro de sodio (mM): 0 y 100 agregado a la solución nutritiva de riego.

Diariamente se registró el pH y conductividad del percolado de las macetas, así como la temperatura y humedad en la cámara.

La cosecha inicial se realizó a la semana 2, luego de la cual comenzó el tratamiento salino sobre las plantas restantes. Luego de 14 días se realizó una segunda cosecha. En ambas se tomaron al azar 6 plantas de cada clon. Después de lavar las raíces con agua desmineralizada, éstas se separaron del vástago para pesar las fracciones por separado. El vástago, a su vez, se subdividió en tallo y hojas y se pesaron por separado. También se contabilizó el número de hojas y el área de las mismas fue tomada con un medidor Licor LI-3000. Las fracciones se dejaron por dos semanas en estufa a 70°C para, luego, tomar el peso seco.

Con las plantas sobrantes de la segunda cosecha se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas:

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

El material vegetal fue homogeneizado con etanol 96° en una relación 1:3 (P:V) durante 2 minutos, se calentó a ebullición durante 5 min. y luego se centrifugó 10 min. a 5000 rpm. Se midió la absorbancia del sobrenadante etanólico en un espectrofotómetro a 654 nm. La concentración de clorofila se determinó de acuerdo a la técnica descripta por Wintermans y De Mots (1965).

DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

La peroxidación lipídica se evaluó como la producción de sustancias reactivas al ác. tiobarbitúrico, midiendo el contenido de MDA por gramo de hoja de hoja. Para ello se homogeneizó el material vegetal en TCA al 20 % (1:10, P:V). A 1 mL de homogenato se le agregó 1 mL de TBA 0,5 % en TCA 20 % y 100 µL de BHT al 4 % en etanol. Se calentó a 95°C durante 25 min. . Luego, se enfrió en baño de hielo y se centrifugó durante 10 min. a 2500 rpm (Sorvall RC 5C). . La absorbancia fue medida en el sobrenadante a 532 nm, sustrayendo la absorbancia de la turbidez a 600 nm. La concentración de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción 155 nM^{-1} cm^{-1}. Como patrón de calibración se utilizó 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (Heath and Packer, 1968).

DETERMINACIÓN DE GLUTATION

La extracción del material vegetal se realizó en ClH 0,1 N (pH 2), relación 1:10 (P:V) (Schupp and Rennenberg, 1988). La determinación se realizó midiendo el aumento de absorbancia a 412 nm debido a la formación de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). Se determinó glutatión total (GSH+GSSG) en un medio de reacción que contenía la muestra y 100 µL de fosfato de potasio 0,5 M (pH 8.0), 700 µL de fosfato de sodio 143 mM (pH 7.5), 6,3 mM de EDTA, 0,21 mM de NADPH y 100 µL de DTNB 6 mM, se incubó durante 12 a 15 min. a 37°C, luego se agregaron 10 µL de glutatión reductasa (266 U mL^{-1}) y se midió el aumento de absorbancia a 412 nm. La cantidad de GSH se determinó a partir de una curva patrón realizada con GSH. Se graficó la pendiente en función de los equivalentes de GSH presentes (Anderson, 1985).

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

La extracción del material vegetal se realizó con ácido perclórico al 70% en una relación 1:10 (P:V). El macerado se centrifugó 18.000 g por 5 '. Al sobrenadante se le agregaron 250 µL de citrato de sodio al 10% (P:V). Con 100 µL de esta mezcla se realizó la siguiente mezcla de reacción: 875 µL de buffer K_2HPO_4 0.2 M, pH:7.00 conteniendo 1 mM de EDTA en una cubeta de cuarzo de 1 mL. Luego de registrar la absorbancia a 254 nm se agregaron 25 µL de ascorbato peroxidasa (0,25 U). La Abs_{254} se monitoreó hasta que no se produjo más decaimiento (3 a 4 minutos) y la concentración de ácido ascórbico (ASC) se calculó según: ε_{256}= 14.1 mM^{-1} cm^{-1} (Dalton et al., 1995).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLUTATION REDUCTASA

El material vegetal fue homogeneizado en una solución extractante conteniendo Tris-ClH 50 mM (pH 7.8) y 1 mg mL^{-1} de EDTA, en relación 1:10 (P:V) a 4°C. El homogenato fue centrifugado por 30 min. a 15000 rpm. La actividad enzimática se realizó a partir del sobrenadante obtenido a 25°C, como disminución de la absorbancia a 340 nm debida al consumo de NADPH en un medio de reacción que contenía Tris-ClH 50 mM (pH 7.5), 0,15 mM de NADPH, 3 mM de Cl_2Mg y 0,5 mM de GSSG. Una unidad enzimática corresponde a µmoles de NADPH oxidados por minuto por g de hoja o mg de proteína, según el experimento realizado (Schaedler and Bassham, 1977).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA

Para la extracción de la enzima se homogeneizó el material vegetal en una solución reguladora conteniendo fosfato de potasio 50 mM (pH 7.8), 0.5 % V:V de Tritón X100, 0,5 mM de EDTA y 1 % P:V de PVP (para remover las interferencias de compuestos fenólicos) (Loomis, 1969), a 4°C. Luego se centrifugó durante 30 min. a 15000 rpm. La actividad enzimática fue determinada como disminución de la absorbancia a 240 nm debido al consumo de H_2O_2 en un medio de reacción que contenía fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0) y 10 mM H_2O_2, la reacción se llevó a cabo a 25 °C. Se determinó la constante de reacción de pseudo primer orden (k'=k x [CAT])

de la disminución de la absorción de H_2O_2 y la concentración de catalasa se calculó en pmol g^{-1} peso fresco usando k=4.7x10^7 M^{-1} s^{-1} (Chance et al., 1979).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ASCORBATO PEROXIDASA

Para la extracción de la enzima se homogeneizó el material vegetal en una solución reguladora conteniendo fosfato de potasio 50 mM (pH 8.0), 5 mM de ác. ascórbico, 1 mM de EDTA y 1 % de PVP. El homogenato se centrifugó a 15000 r.p.m. por 30 min. a 4°C (Sorvall RC 5C). El agregado de ascorbato en la solución de extracción se debe a que la enzima es lábil en ausencia de este compuesto. La actividad enzimática se determinó en el sobrenadante, inmediatamente después de obtenido el mismo, como la disminución de la absorbancia a 290 nm debida a la oxidación del ascorbato (E=2.8 mM^{-1} cm^{-1}) a 30°C, en un medio de reacción que contenía; 0,5 mM de ác. ascórbico, 0,1 mM de H_2O_2, 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.0) y 0,1 mM de EDTA. Una unidad enzimática fue definida como los mmoles de ascorbato generados por min. por g de hoja (Nakano y Asada, 1981).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA

La enzima lipoxigenasa cataliza la adición de O_2 en cis-1, 4 al ácido graso insaturado linoleico produciendo conjugados hidroperóxido linolato que absorben en 234 nm. Para la determinación de esta enzima se utilizó el sobrenadante de homogenatos de material vegetal en relación 1:10 (P:V) en solución reguladora 0.2 M de fosfato de potasio (pH 6.5), conteniendo 1% de Tritón X100, obtenido por centrifugación a 15000 r.p.m. durante 30 minutos (Sorvall RC 5C). La actividad de la lipoxigenasa se determinó a 25°C en un medio de reacción conteniendo 0.2 M de solución reguladora citrato/fosfato de sodio (pH 6.5), 2.28.10^{-4} M de ác. linoleico (cis-9, cis-12 octadecanoico) y 30 µL del sobrenadante. Se midió el aumento de absorbancia a 234 nm (Peever and Higgins, 1989). La actividad se expresó como la variación de absorbancia a 234 nm min^{-1} g^{-1} de hojas.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

El mismo extracto utilizado para dosar catalasa se utilizó para medir SOD. Una unidad de esta enzima se define como la cantidad de extracto necesario para inhibir el 50 % de la fotorreducción del nitrobluetetrazolium (NBT). Se utilizó como solución generadora del anión superóxido un medio que contenía 14.3 mM de metionina, 82,5 μM NBT, 2,2 μM de riboflavina y el volumen apropiado de sobrenadante. Los tubos de reacción fueron colocados a 25°C e iluminados con tubos fluorescentes, la reacción se inicia y termina al ascender y apagar la luz (no hay variaciones detectables de reacción bajo luz ambiente durante la preparación de los reactivos y las medidas electroforéticas), la reducción de NBT fue seguida mediante mediciones de la absorbancia a 560 nm cada 2 minutos durante 12 minutos. Soluciones idénticas se utilizaron como blanco (Becana et al., 1986).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE DEHIDROASCORBATO REDUCTASA

El material vegetal fue homogeneizado en una solución con 50 mM de Tris-ClH (pH:7.8), 1 mg mL^{-1} de EDTA y 2-β-mercaptoetanol en relación 1: 1 (P:V). Se centrifugó a 15000 r.p.m. (Sorvall RC 5C) por 30 minutos. El ensayo se llevó a cabo a 4°C. La enzima se determinó en el sobrenadante por la absorbancia a 265 nm por la aparición de ascorbato. El medio de reacción contuvo 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.00); 0,01 mM de EDTA; 2,5 mM de GSH y 0,2 mM de ácido dehidroascórbico. Una unidad enzimática fue definida como los μmoles min^{-1} mg^{-1} de ascórbico generados

DETERMINACIÓN DE CONDUCTIMETRÍA

La mediciones se llevaron a cabo a partir del segundo par de hojas expandidas de las plantas de ambos clones al finalizar el período de cultivo en los tratamientos salinos. De las hojas se cortaron discos de 1 cm de diámetro y se sumergieron en agua desmineralizada por 1, 2 y 24 hs. Luego de ello se separó el material vegetal y se midió la conductancia eléctrica del medio acuoso (Luna et al., 1994).

ACIÓN DE PRO

realizó por

RESULTADOS

El análisis de crecimiento después de 14 días de recibir el tratamiento salino no reveló diferencias significativas entre los dos clones para los tratamientos 0 mM de ClNa. De los parámetros medidos solo se observaron diferencias entre los pesos frescos de vástago y raíz, no así en los pesos secos de ambos órganos para cada tratamiento (Tabla 3-1). Esto último evidencia un efecto de la sal que no se traduce en una merma del crecimiento de las plantas. Para corroborar esto se calculó el contenido de agua de las plantas. El mismo sigue el patrón observado en peso seco, para los diferentes órganos (Tabla 3-1).

Un análisis detallado de los componentes del RGR, como ser SLA, LAR o LWR, tampoco dieron diferencias significativas entre clones para el tratamiento 0 mM de ClNa (Tabla 3-2). El SLA, LAR y RGR fueron menores en el clon T para el tratamiento 100 mM de ClNa (misma Tabla).

Un resultado no esperado fue el rápido incremento en el número de hojas del clon 150 a 100 mM de sal (dato no mostrado) que no se tradujo en un aumento del área foliar (Tabla 3-1). Este aumento del número de hojas debe ser considerado, porque a diferencia de los ensayos anteriores, las plantas al momento de la cosecha inicial fueron raleadas y por cada una el número de hojas fue el mismo.

Análisis de los parámetros bioquímicos

La concentración de clorofila (a+b) no varió en forma significativa entre clones cuando las plantas fueron crecidas en el tratamiento control (0 mM de sal). Tampoco varió entre tratamientos para el clon 150. Sin embargo, la concentración de pigmentos disminuyó en forma significativa (23 %) cuando las plantas del clon T fueron crecidas en el tratamiento salino (Fig. 3-1).

La conductividad eléctrica fue un parámetro medido para determinar el posible daño provocado sobre las membranas celulares al aplicar el tratamiento salino. No se observaron diferencias significativas entre ambos clones en el tratamiento control dentro de la primer hora de medición. Tampoco se observaron diferencias significativas entre clones a las 2 horas. Sin embargo, se observaron diferencias

cuando las plantas de ambos clones fueron cultivadas en el tratamiento salino. Durante la primer hora de incubación no se observaron diferencias entre clones, aunque la conductividad aumentó al doble respecto del tratamiento control. A las dos horas se registró un aumento de la conductividad eléctrica de 7,3 veces para el clon T y 1,7 para el clon 150 respecto del tratamiento control (Tabla 3-3). Entre clones la diferencia fue del 77 %. Cuando los discos de hojas permanecieron 22 hs. más sumergidos la conductividad registrada siguió siendo mayor (3 %) para el clon T (misma Tabla).

La peroxidación lipídica de las membranas fue medida por la concentración de sustancias reactivas al ác. tiobarbitúrico (Tabla 3-4). Esta permaneció constante entre tratamientos para cada clon. Tampoco se observaron diferencias significativas entre clones (misma tabla).

La concentración de las dos moléculas antioxidantes más importantes del ciclo glutatión-ascórbico fue medida. Tanto el glutatión total como el ác. ascórbico tuvieron mayor concentración en el clon 150 respecto del T en el tratamiento control (Fig. 3-2 A y B). La concentración del glutatión mostró un incremento del 82 % en el clon 150 respecto del T en las condiciones de cultivo basales (Fig. 3-2 A). La concentración de este dipéptido disminuyó en forma marcada al aplicarse el tratamiento salino, aunque no se observaron diferencias significativas entre clones. La magnitud de la reducción fue aún mayor en el clon 150 (77%), mientras que la del T fue del 35 % (misma figura).

Cuando se evaluó la concentración de ác. ascórbico en las plantas no tratadas se observó, al igual que con el glutatión, un mayor nivel basal en el clon 150 (Fig. 3-2 B). La diferencia fue del 36% entre clones en el tratamiento de 0 mM de sal. La concentración del ASC aumentó 83 % en el clon T y 40 % en el clon 150 respecto del tratamiento control, cuando se aplicó el tratamiento salino. En este último caso, las diferencias entre clones tampoco fueron significativas.

La actividad de las principales enzimas - que actúan en la defensa contra el estrés oxidativo - fue evaluada, pudiéndose hallar dos patrones de variación. Mientras que APOx, GR, SOD y DHAR tuvieron patrones parecidos de actividad, CAT y LPOx se mantuvieron constante entre tratamientos (Tabla 3-4 y Figura 3-3).

Las primeras cuatro enzimas muestran un mismo perfil de variación de actividades en el tratamiento control. El clon 150 tuvo mayor actividad enzimática, respecto del T, cuando las plantas crecieron sin ClNa en el medio de cultivo. Sin embargo, la respuesta al tratamiento salino, medida como actividad enzimática, se torna variable según la enzima en estudio. Los incrementos de actividad enzimática del clon 150 respecto del T para el tratamiento control fueron de 48 % para la APOx, 39 % para GR, 48 % para SOD y 26 % para DHAR (Fig. 3-3).

La actividad de la APOx aumentó cuando las plantas de ambos clones fueron crecidas en el tratamiento salino. Ambos clones alcanzaron el mismo nivel de actividad enzimática. Sin embargo, si se tiene en cuenta las diferencias entre clones en el tratamiento control, el porcentaje de incremento fue diferente (25 % en el 150 y 85 % en el T) (Figura 3-3A).

La GR tiene un patrón de variación de actividad muy parecido a la APOx (Figura 3-3B). La actividad enzimática también aumentó en ambos clones cuando las plantas fueron crecidas con altas concentraciones de ClNa. La actividad aumentó 24 % y 62 % en los clones 150 y T respectivamente.

La actividad de la SOD permaneció constante aún cuando las plantas del clon 150 fueron cultivadas en un medio de cultivo con 100 mM ClNa. Muy por el contrario, el clon T aumentó su actividad un 61 % respecto del tratamiento control para la misma enzima (Figura 3-3C). No se observaron diferencias significativas de actividad enzimática entre clones a 100 mM de sal.

Por el contrario, la actividad de la DHAR aumentó cuando las plantas del clon 150 crecieron en presencia del ClNa. El incremento fue significativo y correspondió a un aumento del 33 % (Fig. 3-3 D). Sin embargo, la actividad de esta enzima permaneció constante en el clon T cuando las plantas crecieron en el tratamiento salino (misma figura).

La lipoxigensas es una enzima que cataliza la hidroperoxidación de los ác. grasos insaturados. La actividad de esta enzima puede ser tomada como una manifestación de la peroxidación lipídica que ocurre en las células. Sin embargo, no fueron observadas diferencias entre clones ni tratamientos (Tabla 3-4).

CONCLUSIONES

El análisis de crecimiento no revela diferencias significativas entre ambos clones a las concentraciones de cloruro de sodio estudiadas. Los ensayos, descriptos previamente en perlita e hidroponia, fueron de 28 días. El RGR, de estos ensayos, fue 10% mayor para las plantas del clon 150 en el tratamiento control y 21,5% en el tratamiento con 75 mM de sal respecto del cultivar Kennebec. Por el contrario, los porcentajes fueron 6.48 y 12.5, respectivamente en el presente ensayo. Por lo tanto, el aumento de la actividad antioxidante de las plantas de los clones en estudio es el resultado de una respuesta temprana al estrés osmótico generado (Munns et al., 1997).

Sin embargo, el tiempo de exposición a la sal provocó una disminución en la concentración de clorofila del clon T. La disminución de los contenidos de clorofila como consecuencia del estrés salino ha sido observada por otros autores (Seeman and Critchley, 1985).

La actividad basal de las enzimas del clon 150 fue mayor respecto de la actividad del clon T. Esto ha sido observado en plantas con resistencia al estrés oxidativo (Monk and Davies, 1989, Wise and Naylor, 1987). La actividad de la SOD fue más alta en el clon T a 100 mM de sal respecto del clon 150, y los valores absolutos de actividad fueron parecidos entre ambos clones. El clon 150 no mostró diferencias de actividad entre tratamientos, debido posiblemente, al alto nivel basal de esta enzima. Esta puede ser una ventaja que les permite resistir el alto poder oxidativo generado por la sal.

La glutatión reductasa y la dehidroascorbato reductasa, participan junto con la ascorbato peroxidasa, en el ciclo ascorbato-glutatión, catalizando la reacción que mantiene el pool de ascorbato y glutatión. Estos son esenciales para el funcionamiento antioxidante de los cloroplastos (Smith et al., 1989). La actividad de la GR y DHAR fue constitutivamente más alta en el clon tolerante en ausencia del factor de estrés. La GR es esencial para la regeneración del GSH y es considerada como una enzima limitante en la detoxificación del H_2O_2 (Jablonski and Anderson,

1981). Ambos clones aumentaron la actividad de la GR a valores similares bajo condiciones de estrés salino. Sin embargo, se observó que la concentración de glutatión disminuyó como consecuencia de la sal en ambos clones. La disminución fue más marcada en el clon 150, debido, posiblemente, a una mayor actividad de la DHAR. El alto contenido de ASC puede, también, ser el resultado del aumento de la DHAR en el mismo clon en condiciones de salinidad elevada.

Gossett et al. (1996) también encontraron una disminución de la concentración de glutatión total en líneas celulares tolerantes al ClNa y crecidas en 150 mM de ClNa. Estos autores sugieren que durante el estrés oxidativo generado por el ClNa el nivel de ascorbato aumenta hasta saturar el ciclo ascorbato-glutatión. De esta manera el glutatión disminuye de tal manera que la GR aumenta para permitir una relación GSH/GSSG favorable hacia la reducción del ascorbato.

La diminución del glutatión también podría deberse a que el glutatión está siendo secuestrado por alguna ruta metabólica alternativa. Según Dalton (1995) este dipéptido estimula la transcripción de genes de defensa que codifican para glicoproteínas de pared. Las mismas son ricas en hidroxiprolina. Esta tiene como precursor la prolina, un osmolito importante para evitar el estrés osmótico (Perez-Alfocea and Lerher, 1995).

La inhibición de la actividad de la catalasa puede sugerir que el H_2O_2 en realidad no se acumule en el peroxisoma, sino que se libera hacia el citoplasma. El daño provocado en las membranas intracelulares, medido por conductividad eléctrica, evita la acumulación del mismo. Este daño sobre las membranas estaría provocado por la sal o por el estrés osmótico generado. Según Corpas y colaboradores (1993) la liberación del peróxido hacia el citosol también explicaría la ausencia de peroxidación lipídica (medida como concentración de MDA). La medición de la conductividad eléctrica reveló que el clon T tuvo mayor daño sobre sus membranas que el clon 150. Esto se observa claramente en la medición realizada a las 24 hs, donde el aumento de conductividad es considerable (97,55 dS/m).

La diferente susceptibilidad entre clones al ClNa y al estrés osmótico generado puede ser explicada por una respuesta antioxidante rápida y eficiente del clon 150

respecto del T. Todas las enzimas del primero tienen un nivel basal de actividad más alto. Al exponer las plantas a un medio salinizado la actividad enzimática aumenta en las plantas del clon 150 y T. Esto demuestra que existe un estrés oxidativo como consecuencia del salino. La excepción a este patrón es SOD, cuyo nivel basal es tan alto que el estrés salino parecería no afectar su actividad.

TABLA 3-1: Peso fresco y seco para vástago y raíz.

PARAMETRO	TRAT. ClNa mM	CLON T	CLON 150
AREA FOLIAR	0.5	213.266± 3.22	210.200± 3.74
(cm^2)	100	102.316± 3.35	117.540± 6.3
PESO FRESCO	0.5	16.720 ±0.28	14.123 ± 0.26 *
VASTAGO (g)	100	10.122 ± 2.58	9.539± 0.50
PESO SECO	0.5	0.974 ± 0.01	0.871 ± 0.01
VASTAGO (g)	100	0.680 ± 0.14	0.591 ± 0.03
PESO FRESCO	0.5	5.349 ± 0.05	4.283 ± 0.06
RAIZ (g)	100	2.105 ± 1.17 bc	0.736 ± 0.66
PESO SECO	0.5	0.296 ± $2.9E^{-3}$	0.272 ± $3.16E^{-3}$
RAIZ (g)	100	0.116 ± 0.04	0.111 ± 0.06
BIOMASA	0.5	1.27 ± 0.04	1.15 ± 0.04
(g)	100	0.797 ± 0.05	0.70 ± 0.03
CONTENIDO DE AGUA	0.5	20.79 ± 0.96	17.26 ± 1.31 *
(PF-PS) PS^{-1}	100	11.43 ± 0.76	9.57 ± 0.66

* $p \leq 0.05$

TABLA 3-2: Tabla de medias para el SLA, LWR, LAR y RGR.

CLON-TRAT.	SLA (cm^2/g)	LWR	LAR (cm^2/g)	RGR (d^{-1})
T- 0.5 mM	384.10	0.440	185.89	0.173
T- 100 mM	276.84	0.492	128.51	0.126
150- 0.5 mM	410.92 *	0.460	168.44	0.185
150- 100 mM	347.17	0.496	168.44 *	0.144 *

* $p \leq 0.05$

TABLA 3-3: Conductividad eléctrica medida en discos de hojas sumergidos por 1, 2 o 24 horas en solución acuosa.

	0.5 mM		100 mM	
dS/m	T	150	T	150
1 h	27.30 ± 2.2	28.50 ± 1.3	52.70 ± 3.5	53.20 ± 4.2
2 h	24.85 ± 0.85	26.70 ± 1.34	183.55 ± 8.85	41.35 ± 5.40
24 hs.	21.35 ± 1.6	15.07 ± 0.4	97.55 ± 14.1	26.35 ± 2.65

TABLA 3-4: Concentración de MDA y actividad de LPOx y CAT.

	0.5 mM		100 mM	
	T	150	T	150
MDA (nmol. g^{-1} hoja)	28.45 ± 2.51	34.56 ± 4.06	28.21 ± 3.21	29.47 ± 2.36
LPOX (U min. g^{-1} hoja)	1.38 ± 0.191	1.60 ± 0.167	1.32 ± 0.027	1.22 ± 0.043
CAT (pmol min. g^{-1} hoja)	4.69 ± 0.266	4.83 ± 0.497	5.76 ± 0.505	4.46 ± 0.155

FIGURA 3-1: Concentración de clorofila a+b (μg g^{-1} de hoja) en hojas de plantas sometidas a dos tratamientos salinos.

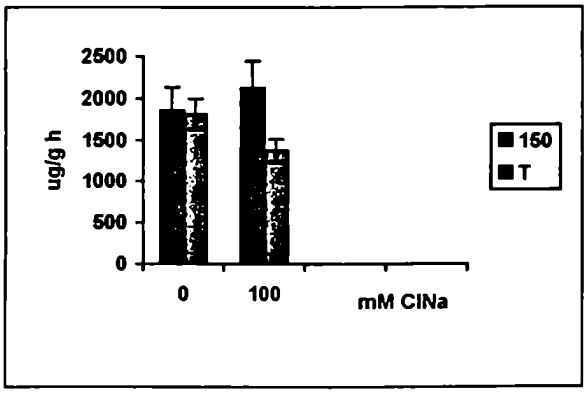


FIGURA 3-2: Concentración de A: glutatión total, y B: ác. ascórbico.

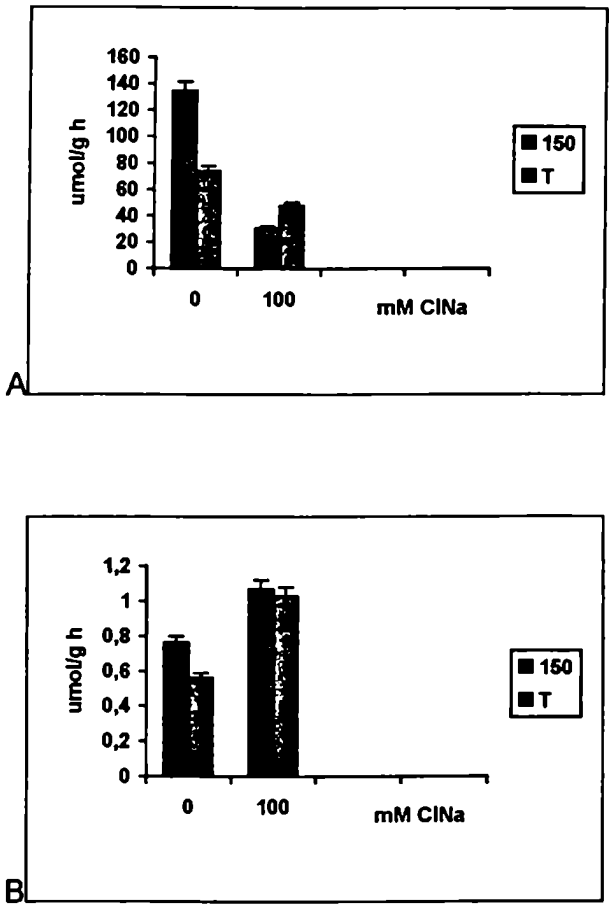
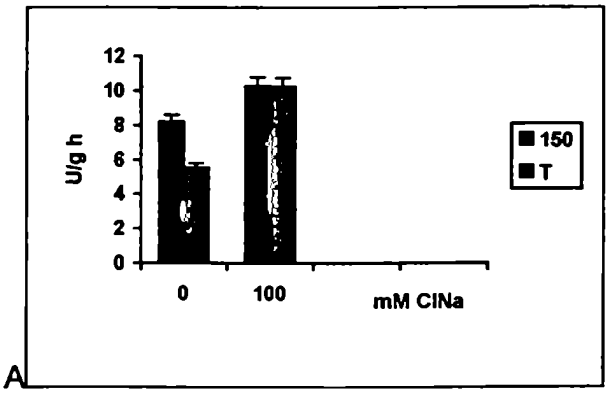
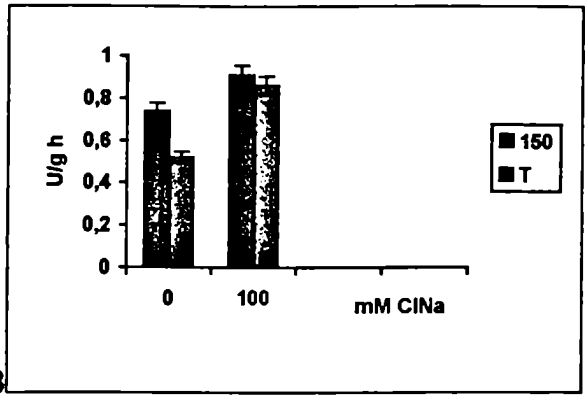


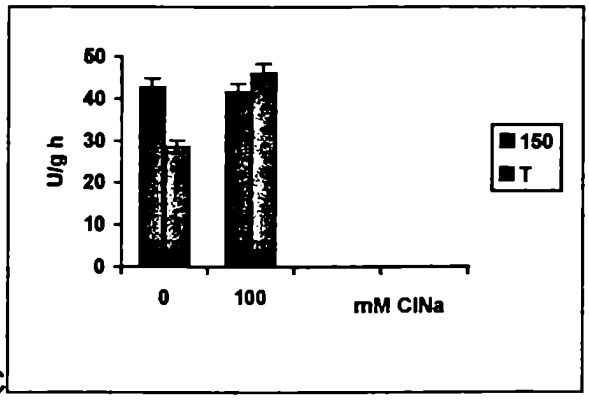
FIGURA 3-3: Actividad enzimática de A: ascorbato peroxidasa, B: glutatión reductasa; C: superóxido dismutasa, y D: dehidroascorbato reductasa.



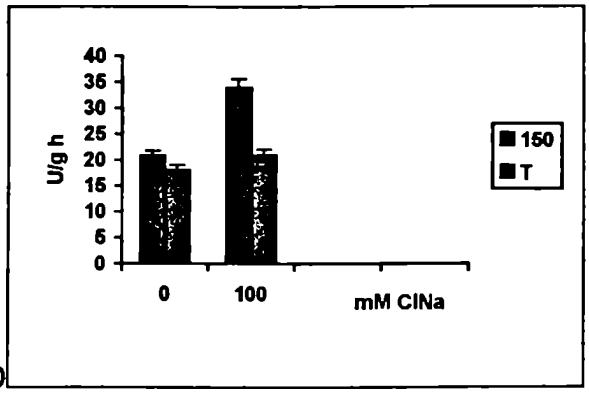
B


1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
U/g h
0
100
mM ClNa
150
T

C


50
40
30
20
10
0
U/g h
0
100
mM ClNa
150
T

D


40
35
30
25
20
15
10
5
0
U/g h
0
100
mM ClNa
150
T

CAPÍTULO 4

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO ENTRE CALLOS Y PLANTA

La selección recurrente *in vitro* puede ser utilizada para estudiar los procesos metabólicos y los mecanismos que intervienen en la tolerancia a la sal (Chadler and Thorpe, 1986, Olmos et al., 1994). Las técnicas de cultivo de tejidos y la selección recurrente *in vitro* han sido empleadas en numerosos trabajos como herramientas para introducir mejoras en los cultivos. Sin embargo, no siempre se ha encontrado una correlación entre la respuesta obtenida durante el cultivo *in vitro* y la planta regenerada. Si lo que se busca es una tolerancia a la sal, el trabajo se complica aún más debido a la asociación de una respuesta compleja de la planta como un todo (Munns, 1993).

Tal (1996) cita varios trabajos donde se ha hallado una correlación positiva entre callos sometidos a un estrés salino y las plantas regeneradas de los mismos. Pérez-Alfocea et al. (1994) realizaron un estudio comparativo entre hojas de plantas y callos provenientes de *Lycopersicon esculetum* (l.) Mill., *L. pennellii* (Correll) D'Arcy y su híbrido interespecífico. En el mismo, se puede observar una correlación positiva en algunas de las variables en estudio. Morpurgo (1991) también estudió la correlación entre plantas de papa cultivadas *in vitro* con plantas de *in vivo*.

Los primeros ensayos realizados en la presente tesis prueban las diferencias fenotípicas y genotípicas entre el clon 150 y la variedad testigo, Kennebec. Sin embargo, las características observadas durante la etapa de selección recurrente *in vitro* no pueden ser atribuidas a los cambios genéticos observados en las plantas regeneradas. Debido a ello, se plantearon en este ensayo los siguientes objetivos:

♠ inducir la formación de callos a partir del clon 150 y T

♠ determinar un patrón de crecimiento en condiciones fisiológicas normales y en estrés salino y compararlo entre ambos clones

♠ analizar el balance iónico de los callos de ambos clones en las diferentes condiciones de cultivo

♠ determinar si los callos del clon 150 son tolerante al estrés salino

♠ encontrar una respuesta antioxidante en los callos del clon 150 cuando son crecidos en condiciones de salinidad

♠ hallar una correlación positiva entre ambos niveles de organización para la respuesta al estrés salino.

MATERIALES Y MÉTODOS

INDUCCIÓN DE CALLOS Y SUSPENSIONES CELULARES

La inducción de callos se realizó a partir de secciones de hojas y tallos de los clones T y 150. El material madre provino del cultivo *in vitro* por lo cual no fue necesario la desinfección del mismo. A cada sección de tallo de 1,5 cm se le extrajo todas las hojas y yemas. Las hojas de más de 0,5 cm de largo se seccionaron en el ápice y el pecíolo. Estas y los tallos se dañaron con el bisturí a nivel de epidermis y fueron sembradas en medio de cultivo con la siguiente composición: sales y vitaminas de MS (Murashige and Skoog, 1962), mio-inositol 100 mg/L, glicina 5 mg/L, ácido ascórbico 100 mg/L, ácido cítrico 100 mg/L, sacarosa 30 g/L y agar 8 g/L. Las combinaciones hormonales estudiadas son descriptas en la tabla 4-1. Cada explanto fue sembrado en un tubo de 115X22 mm con 10 mL de medio de cultivo. El número de repeticiones por tratamiento fue de 20. El pH fue ajustado a 5.7 y el medio fue esterilizado por 15 minutos a 120 MPa.

Cada frasco de cultivo fue considerado como una repetición, en el mismo se sembraron 5 explantos, y por cada clon hubo 10 repeticiones. Los mismos se dispusieron en una cámara de cultivo a 24 ±1 °C y con un fotoperíodo de 16 hs.

Luego de 21 días los callos inducidos fueron repicados al mismo medio de iniciación pero con la dosis de Picloram disminuida a la mitad. A las tres semanas se repicó a medio líquido con la misma composición del anterior en Erlenmeyers de 125 cm^3 de capacidad y con 20 mL de medio. El inóculo inicial tuvo un peso medio seco de 1.5 mg. Las suspensiones celulares se dispusieron en la misma cámara de cultivo en un agitador rotatorio a 125 rpm.

Cosechas: Para calcular la tasa de crecimiento de las suspensiones celulares por el método del C.P.V. (Cell Pack Volume) los datos fueron recabados día por medio durante 30 días. Para ello se siguió la metodología descripta por Ryu and Lee (1989). Cada cosecha consistió en pasar toda la suspensión de un Erlenmeyer a un tubo cónico y graduado para centrífuga de 10 cm^3 de capacidad. Para ello se filtró previamente en papel Whattman N° 3. El filtrado se centrifugó a 2000 r.p.m. por 20

minutos (Gelectronic, G4). Se midió el C.P.V. y todo el material fue recolectado para secar en estufa a 80 °C por 48 hs.

La tasa de crecimiento (RGR) fue calculada como la pendiente de la curva: días en cultivo vs. peso seco o C.P.V.

o según la fórmula: $\{ \ln(w_f) - \ln(w_i) \} \Delta t^{-1}$

donde w_f es el peso fresco al estadio final, w_i al estadio inicial y Δt es intervalo de tiempo entre ambas cosechas.

ENSAYOS DE SALINIDAD

A partir de los callos inducidos y crecidos en medio con Picloram (2 mg/L) se iniciaron los ensayos de salinidad. El tratamiento fue el mismo medio de cultivo con o sin el agregado de 100 mM de ClNa.

El medio de cultivo fue envasado en frascos de 250 cm^3 de capacidad con 50 mL de medio. Cada frasco de cultivo fue considerado como una repetición. Los explantos fueron sembrados de a dos por frasco, y, por cada tratamiento hubo 10 repeticiones. Los mismos se dispusieron en la misma cámara de cultivo.

A los 21 días de cultivo se cosecharon los callos. La tasa de crecimiento (RGR) fue calculada por fórmula (ver análisis de crecimiento).

Además, se realizaron las siguientes mediciones bioquímicas:

DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO

Ver ensayo de Estrés Oxidativo en Plantas

DETERMINACIÓN DE GLUTATION

Ver ensayo de Estrés Oxidativo en Plantas

DETERMINACIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILOS TOTALES

Ver ensayo de Estrés Oxidativo en Plantas

DETERMINACIÓN DE GLUTATION REDUCTASA

Ver ensayo de Estrés Oxidativo en Plantas

DETERMINACIÓN DE CATALASA

Ver ensayo de Estrés Oxidativo en Plantas

DETERMINACIÓN DE ASCORBATO PEROXIDASA

Ver ensayo de Estrés Oxidativo en Plantas

DETERMINACIÓN DE CONDUCTIMETRÍA

Se tomó por triplicado 500 mg de callo de cada tratamiento y clon. Los trozos fueron incubados en agua desmineralizada por 1 hora. Luego fueron centrifugados por 20 minutos a 2000 r.p.m. (Sorvall A-500). La conductimetría fue medida en el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido y se repitió la operación a las 2 y 24 hs. (Luna et al., 1994).

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS

Se realizó por el método de Lowry (1951) utilizando albúmina bovina como estándar

Medición de los iones sodio y potasio (Hunt, J, 1982)

Tres callos de cada clon y de los tratamientos de 0 y 75 mM de sal fueron cosechados y se registró su peso fresco y seco. Luego fueron transferidos a viales plásticos para proceder a la digestión ácida. Para ello se agregó una solución 0.5 M de ClH en relación 1:10 (P:V). Los viales permanecieron en agitación constante por 72 hs. a 24±1°C. Antes de la medición cada muestra fue diluida con una solución acusa de lantano cesio (0.1 %) en relación 1:10 (P:V). Los cationes Na^+ y K^+ fueron determinados en un espectrofotómetros de absorción atómica (Buck-Scientific, con lámparas para sodio y potasio Westinghouse).

RESULTADOS

INDUCCIÓN DE CALLOS Y SUSPENSIONES CELULARES:

La inducción de callos fue obtenida a partir del cultivo de secciones de tallos para ambos clones en diferentes medios de cultivo (Tabla 4-1 y 2). Los resultados se evaluaron teniendo en cuenta una clasificación según la cual se le asignó el número 4 a aquellos medios que lograron inducir callos totalmente desdiferenciados, friables y de colores claros (amarronado o amarillento) que permitieran continuar con el cultivo de suspensiones celulares, el 3 para los callos que luego de los sucesivos repiques diferenciaron raíces, el 2 a los explantos que solo formaron un callo sobre las superficies de corte a modo de tejido de cicatrización, 1 para los casos en que los tratamientos indujeron el crecimiento de brotes y/o raíces y 0 si los tratamientos no indujeron cambio alguno sobre el explanto.

Los resultados obtenidos con las diferentes combinaciones hormonales ensayadas fueron similares cuando se utilizaron secciones de tallos como explanto inicial Algunas de ellas posibilitaron la proliferación de pequeños agrupados celulares en la superficie del explanto. Por el contrario, no se pudo obtener la proliferación de callos a partir de secciones de hojas utilizadas como explanto inicial a ninguna de las concentraciones hormonales utilizadas.

Los períodos de cultivo mayores a 21 días no favorecieron la inducción del callo, sino que sólo se obtuvo la oxidación progresiva del explanto en la mayoría de las combinaciones hormonales (Tabla 4-2). Por otro lado, si el repique se realizaba cada 7 se inducía la proliferación de callo en alguno de los medios utilizados. Sin embargo, los períodos de cultivo deben ser mayores cuando se trata de analizar el crecimiento de los callos de ambos clones en un gradiente de ClNa.

Los callos obtenidos con Picloram (4 mg/L) fueron los que se pudieron mantener por mayor tiempo en cultivo sin diferenciación de tejidos ni oxidación de los mismos. El subcultivo de los callos al medio fresco cada 21 días posibilitó el crecimiento rápido de los mismos. El material fue repicado al mismo medio de cultivo pero con la dosis de Picloram reducida a la mitad. Esta última modificación se realizó por que se obtenían los mismos resultados con la mitad de la dosis del regulador de crecimiento.

ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

Durante los 26 días del período de cultivo de las suspensiones celulares se pudieron diferenciar tres fases de crecimiento: inicial, caracterizada por un crecimiento moderado de la población celular, logarítmica, con un crecimiento acelerado desde el día 6 aproximadamente y senescente, desde el día 21 para el clon T (Fig. 4-1). La metodología empleada para describir el crecimiento en el tiempo fue por el C.P.V. y por la variación del peso seco. El RGR fue calculado a partir de la pendiente de la curva de crecimiento descripta a lo largo del tiempo en estudio o por la metodología clásica (ver materiales y métodos). El período considerado para su cálculo fue desde el día 6 al 26, cuando el crecimiento aumentó en forma exponencial (misma tabla). Un mayor período de cultivo introducía un error considerable, debido, posiblemente, a una mayor heterogeneidad de los datos.

Las diferencias encontradas entre los RGR pueden ser atribuidas a un error de manipuleo durante la recolección del material. Para evitar ello, se buscó estandarizar el muestreo. Aún así, la tendencia de los resultados es la misma en los cuatro RGR y coinciden los órdenes de magnitud de tres de ellos (C.P.V. en las dos formas de calcularlo y peso seco por fórmula) (Tabla 4-3). El RGR fue, en todos los casos, mayor para el clon 150.

ENSAYOS DE SALINIDAD

Después de 3 subcultivos en el medio descripto más arriba se inició el tratamiento salino con 100 mM ClNa y se lo comparó con un tratamiento control sin el agregado de sal. La curva de crecimiento se construyó a partir de los datos de tres cosechas realizadas con 14 días de diferencia entre ellas (Fig. 4-2). La cosecha inicial se realizó al momento de la siembra del explanto inicial. Debido a que el tamaño del explanto inicial fue estandarizado para ambos clones no se observaron diferencias entre ellos. El peso fresco de los callos aumentó durante los primeros 14 días y no varió en forma significativa entre ambos clones. Sin embargo, a los 28 días los callos del clon 150 continuaron aumentando el peso, mientras que los del T redujeron en forma significativa la pendiente. Para comparar entre clones el aumento de producción (medido como peso fresco de los callos) se estimó la tasa de

crecimiento en un período de cultivo de 28 días. El RGR de los callos del clon 150 cultivados en el tratamiento control fue de 0.072 d^{-1} , mientras que el RGR de los callos del clon T fue significativamente inferior (0.065 d^{-1}). Cuando los callos fueron cultivados con el agregado de 100 mM ClNa la relación fue la misma; el RGR del clon 150 (0.034 d^{-1}) fue superior en forma significativa al del clon T (0.029 d^{-1}).

Cuando se analizó la concentración interna de los iones Na^+ y K^+ se observó que no hubo diferencias significativas entre clones para el tratamiento control (Tabla 4-4). Sin embargo, la concentración de sodio aumentó 21 veces, cuando los callos del clon T fueron cultivados en presencia de 100 mM ClNa. Mientras que los callos del clon 150 aumentaron 7 veces el contenido de Na^+ en el mismo tratamiento (Tabla 4-4). La concentración de K^+ también aumentó como consecuencia de cultivar los callos de ambos clones en 100 mM ClNa. El aumento de este ión fue de 25 veces en los callos del clon T respecto del tratamiento control. Por el contrario, el aumento de la concentración de K+ fue de solo 14 veces en el clon 150 (Tabla 4-4).

La relación K^+:Na^+ del clon 150 fue superior en el tratamiento control respecto del clon T. Esta relación aumentó en el clon 150 2,5 veces respecto del tratamiento control y 6 veces respecto del clon T (Tabla 4-4). Por el contrario, el clon T mantuvo la misma relación entre ambos iones para ambos tratamientos.

El aumento de sodio y la disminución de la relación K^+:Na^+ pueden ser uno de los determinantes de la disminución del RGR en los callos del clon T. Esto también fue observado en el sistema de planta entera y puede ser atribuido al efecto tóxico del Na+ sobre el metabolismo celular.

Estrés oxidativo

Una forma de evaluar el estrés oxidativo es medir el daño provocado a las membranas celulares por el aumento de los radicales libres. Para estudiar los mecanismos de defensa antioxidante se midieron los compuestos y enzimas intervinientes en el ciclo ascórbico-glutatión, así como también la actividad de SOD.

La conductividad eléctrica de callos sumergidos por una o 24 hs en soluciones acuosas es una forma indirecta de medir el daño. Los resultados muestran que el

tratamiento salino provocó daños en las membranas de ambos clones. Sin embargo, el aumento de la conductividad fue del 414 % para los callos del clon T, mientras que para el clon 150 fue del 369 % respecto del tratamiento control a la hora de sumergidos en solución acuosa (Tabla 4-5). Luego de 24 horas de inmersión la conductividad registrada fue menor, aunque el daño registrado en los callos del clon T parece ser mayor que en el clon 150. El clon T cultivado en presencia de 100 mM de sal aumentó 214 % la conductividad respecto del tratamiento control. La misma comparación para el clon 150 mostró un aumento de conductividad de solo 118 % (misma tabla).

La peroxidación lipídica, otra forma de determinar el daño oxidativo, fue evaluada por el aumento de la concentración de MDA en forma indirecta. La concentración de MDA fue la misma para los callos de ambos clones crecidos en el tratamiento control (Tabla 4-6). Sin embargo, la concentración de la misma aumentó un 4,28 % cuando los callos del clon T crecieron en presencia de sal (misma tabla).

La lipoxigensas es una enzima cuya actividad puede ser tomada como una manifestación de la peroxidación lipídica que ocurre en las células. Sin embargo, no fueron observadas diferencias de actividad enzimática entre clones ni tratamientos (Tabla 4-6).

La concentración de glutatión fue mayor en los callos del clon T que los del 150 en el tratamiento control (Fig. 4-3). Cuando los callos fueron cultivados con altas concentraciones salinas se observó una disminución de la concentración de este dipéptido respecto del tratamiento control en el clon T (misma figura). Por el contrario, la concentración del mismo se mantuvo constante entre tratamientos en los callos del clon 150 (misma figura).

La actividad enzimática varió entre tratamientos y entre clones (Fig. 4-4). La ascorbato peroxidasa y catalasa mostraron un mayor nivel de actividad enzimática en el clon 150 respecto del clon T en el tratamiento control (Fig. 4-4 A y B). Sin embargo, al aplicar el tratamiento salino la actividad de la CAT disminuyó en ambos clones (Fig. 4-4 A). El clon 150 tuvo una disminución del 54 %, mientras que el T perdió solo 24 % de actividad (misma figura). La AP mantuvo la misma actividad aún a las diferentes concentraciones de sal en las que fueron crecidos los callos de cada clon (Fig. 4-4

B). Entre clones hubo una diferencia de actividad enzimática de 15 % en ambos tratamientos.

La glutatión reductasa y la dehidroascorbato peroxidasa mostraron un mayor nivel de actividad en el clon T en el tratamiento control (Fig. 4-4 C y D). Sin embargo, cuando los callos fueron crecidos en el medio de cultivo salino la actividad de la GR fue la misma para ambos clones (Fig. 4-4 C). Por el contrario, la actividad de la DHAR aumentó en forma significativa respecto del tratamiento control. El aumento fue del 218 % para el clon 150 y 104 % para el T (misma figura).

La actividad de SOD fue la misma para ambos clones en el tratamiento control. Cuando los callos fueron crecidos en medios con ClNa, la actividad de esta enzima aumentó en ambos clones (Fig. 4-4 E). La mayor actividad se registró en el clon T con un incremento del 49 % respecto del tratamiento control (misma figura).

CONCLUSIONES

La inducción de callos, aptos para el posterior cultivo de suspensiones celulares y estudios de salinidad, fue posible a partir de cultivos de secciones de tallos con el agregado de Picloram (4 mg/L) como regulador del crecimiento. Para la etapa de multiplicación los callos fueron subcultivados al mismo medio pero con la dosis del regulador de crecimiento reducida a la mitad. Las suspensiones celulares comenzaron a las 6 semanas de iniciados los cultivos de los callos. Sin embargo, los ensayos de salinidad se llevaron a cabo con callos. Esto se debió a que el análisis de crecimiento de las suspensiones celulares mostró deficiencias desde un punto de vista estadístico. El aumento del error en cada medición evidenció un sistema frágil y poco exacto. Sin embargo, el análisis de crecimiento de las suspensiones celulares marcó diferencias entre las suspensiones de ambos clones. Las suspensiones del clon 150 crecieron más que las del T, lo que coincidió con las observaciones en los sistemas de planta entera.

Para los ensayos de salinidad se eligió un período entre repiques de 21 días. Durante este período la tasa de crecimiento de ambos clones fue la misma en el tratamiento control. Sin embargo, cuando los callos fueron cultivados con 100 mM ClNa se observó, al igual que en los sistemas de planta entera, mayor tolerancia del clon 150 que del T. La tasa de crecimiento del clon T disminuyó en forma significativa respecto del tratamiento control.

La disminución del crecimiento en los callos del clon T también puede ser atribuida, al igual que en el sistema de planta entera, a una mayor susceptibilidad a las altas concentraciones de Na^+ y la baja relación Na^+/K^+.

A diferencia de los resultados hallados en el sistema de planta entera, los callos sufrieron daños en las membranas celulares y evidenciaron un aumento de la peroxidación lipídica como consecuencia del estrés oxidativo generado por el estrés salino. El aumento de actividad de algunas enzimas (DHAR, SOD) evidencia una respuesta antioxidante. Sin embargo, la disminución de la actividad de otras (CAT) o la ausencia de variación entre tratamientos (AP y GR) ponen en duda si los

resultados hallados pueden ser definidos como de actividad antioxidante en los callos de ambos clones.

TABLA 4-1: : Combinación hormonal agregada al medio de cultivo básico (MS) para la inducción de callos en secciones de tallos u hojas.

TRATAMIENTO	AGREGADO HORMONAL
ANA	ANA 10
2,4-D	2,4-D 10
BAP	BAP 10
IBA	IBA 0,6 + KIN 2,1
ANA-CH	ANA 8 + CH 0,25
2,4-D-CH	2,4-D 8 + CH 0,25
2,4-D/2-CH	2,4-D 4 + CH 0,25
ANA/2-CH	ANA 5 + CH 0,25
2,4-D-KIN	2,4-D 1 + KIN 0,01
ANA-Z	ANA 0,018 + Z 1
ANA-B	ANA 0,018 + BAP 0,23
2,4-D/100-CH	2,4-D 0,01 + CH 0,25
2,4-D/200-CH	2,4-D 0,05 + CH 0,25
2,4-D/S-CH	2,4-D 0,005 + CH 0,25
PIC 2	PICLORAM 2
PIC 4	PICLORAM 4

MS= sales de Murashige and Skoog (1964)
CH= caseina hidrolizada
ANA ác. α-naftalen-acético
IBA ác. indol-3-butírico
2,4-D ác. 2,4-diclorofenoxiacético
PIC Picloram (ác. 4-amino- 3, 5, 6-tricloropicolínico)
KIN cinetina
BAP 6-benzilaminopurina
Z zeatina

TABLA 4-2: Resultados obtenidos para la inducción de callos a partir de secciones de tallos en ambos clones. El resultado fue clasificado según: 0 (no formación de callo) a 4 (crecimiento masivo de callo desdiferenciado).

días	TRAT.	RESULTADO	TRAT.	RESULTADO
7	ANA	4	ANA-Z	0
21		2		0
30		2		0
7	2,4-D	4	ANA-B	0
21		3		0
30		2		0
7	BAP	0	2,4-D/100-CH	3
21		0		2
30		0		2
7	IBA	1	2,4-D/200-CH	2
21		1		2
30		1		0
7	ANA-CH	2	2,4-D/5-CH	4
21		1		3
30		0		3
7	2,4-D-CH	3	ANA/2-CH	2
21		2		1
30		1		1
7	2,4-D/2-CH	3	2,4-D-KIN	0
21		2		0
30		2		0
7	PIC 2	2	PIC 4	3
21		3		4
30		2		3

TABLA 4-3: Tasa de crecimiento relativo (RGR) para las suspensiones celulares, estimada a partir de la pendiente de la curva de crecimiento (b) o por el método clásico; a partir de las variables C.P.V. o peso seco.

	C.P.V. (cm)		peso seco (g)	
RGR	clon T	clon 150	clon T	clon 150
b	0.151 R^2=85.3	0.157 * R^2=83.57	0.0027 R^2=77.76	0.0039 * R^2=77.06
$\{ \ln(w_f) - \ln(w_i) \} \Delta t^{-1}$	0.256	0.252	0.193	0.193

* ANOVA ($p<0.05$)

TABLA 4-4: Concentración de los iones sodio (Na^+) y potasio (K^+) (µg del ion/PF de callo) y la relación entre ambos.

mM ClNa	0.5 mM		100 mM		
	T	150	T	150	control H_2O
Na^+	38.69*	21.98	810.72*	156.21	0.14
K^+	0.94	1.30	23.20*	18.47	0.14
K^+: Na^+	0.02	0.05*	0.02	0.118*	

* ANOVA ($p<0.05$)

TABLA 4-5: Conductividad eléctrica medida a 1 y 24 hs de incubación de callos en soluciones acuosas.

TRAT.	0.5 mM		100 mM		control
(dS m^{-1})	clon T	clon 150	clon T	clon 150	H_2O
1 hs	3.08 ± 0.59 c	3.02 ± 0.12 c	12.76 ± 0.60 a	11.17 ± 0.97 b	0.025
24 hs	1.90 ± 0.02 c	1.76 ± 0.90 c	4.08 ± 0.29 a	2.08 ± 0.10 b	0.044

Las letras señalan diferencias entre clones para cada tratamiento, ANOVA, y test de Tukey ($p<0.05$)

TABLA 4-6: Concentración de malón dialdehido y lipoxigenasa.

	0.5 mM		100 mM	
	clon T	clon 150	clon T	clon 150
MDA $\mu Mol.g^{-1}$	38.55 ± 0.797	35.61 ± 1.142	40.20 ± 0.872 a	37.33 ± 1.920 b
LPOX $U.min^{-1}.g^{-1}$	1.376 ± 0.191	1.606 ± 0.167	1.288 ± 0.027	1.256 ± 0.043

ANOVA ($p < 0.05$), las letras indican diferencias entre tratamientos y clones en una misma fila.

FIGURA 4-1: Curva de crecimiento realizada a partir del C.P.V. durante 26 días de cultivo de las suspensiones celulares.

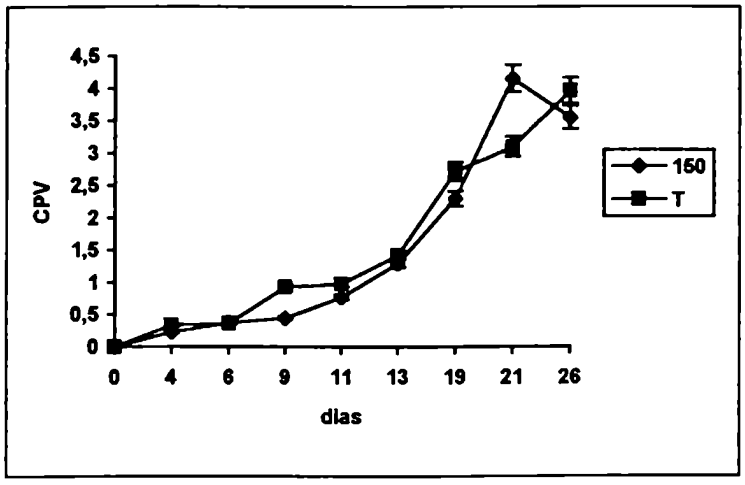


FIGURA 4-2: Curva de crecimiento realizada a partir de callos crecidos en medio de cultivo con Picloram (2 mg/L) durante 32 días en cultivo.

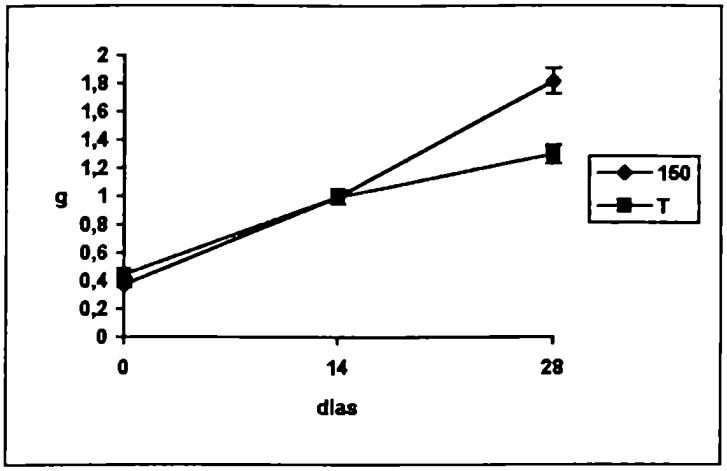


FIGURA 4-3: Concentración de glutatión total.

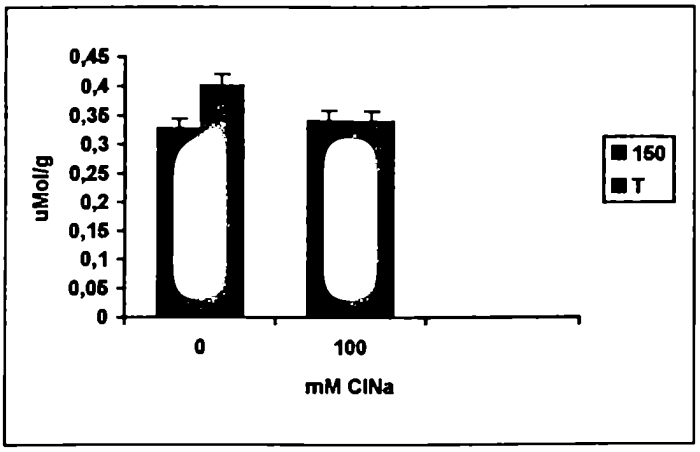
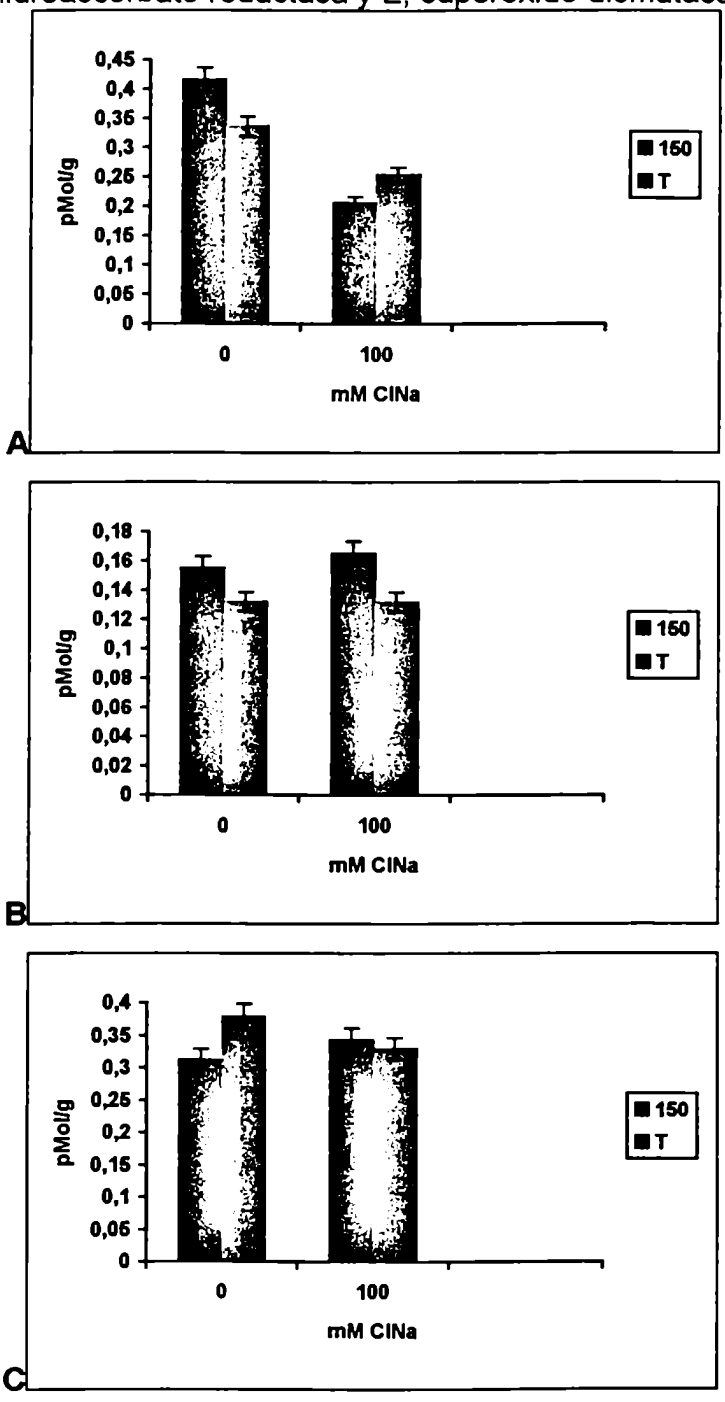
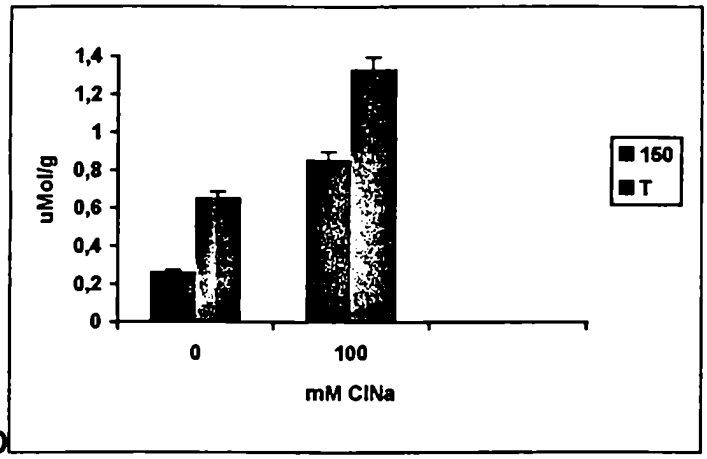


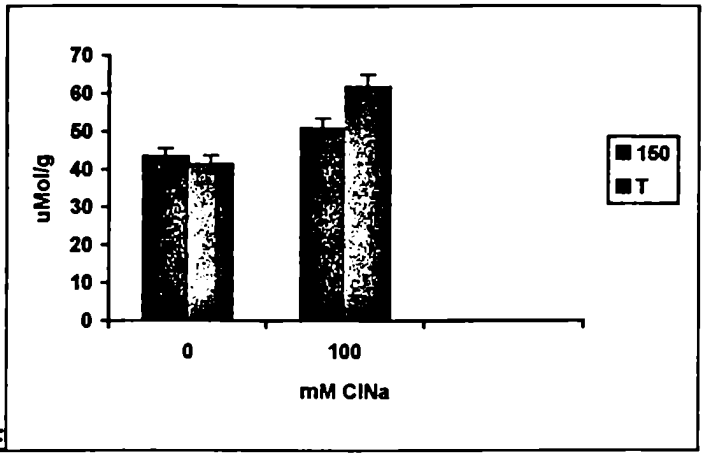
FIGURA 4-4: Concentración de: A, catalasa; B, ascorbato peroxidasa; C, glutatión reductasa; D, dehidroascorbato reductasa y E, superóxido dismutasa.



D


1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
uMol/g
0
100
mM ClNa
150
T

E


70
60
50
40
30
20
10
0
uMol/g
0
100
mM ClNa
150
T

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL CLON 150

El cultivar Kennebec es tetraploide (4X) y heterocigota, debido a ello existe una incompatibilidad para multiplicarlo por vía sexual y llevar a cabo los estudios clásicos de genética para determinar las posibles mutaciones que hayan sucedido (Bonierbale et al., 1990, Potter, R, 1991, Rasmussen y Rasmussen, 1995). Esto se debe a que la papa tiene una alta frecuencia de mutantes meióticas que impiden el desarrollo de las gametas reducidas (Bonierbale et al., 1990). Es por ello que, para identificar las posibles variaciones ocurridas en el ADN se debe llevar a cabo una certificación por un método molecular (RAPD´s) y/o bioquímico (isoenzimáticos) (Scandalios, 1969, Wetter and Dyck, 1992, Gottlieb, 1982, Potter, R, 1991, Rasmussen and Rasmussen, 1995, Mandolino et al., 1997, Milbourne et al, 1997, Schneider and Douches, 1997).

Isoenzimas

Las isoenzimas son las múltiples formas de una enzima que utiliza la misma o similar especificidad en un mismo organismo. Las mismas se pueden clasificar en dos grandes grupos: a) aquellas compuestas por diferentes polipéptidos que han sido codificados en diferentes loci; b) otros cuyos resultados provienen de modificaciones en la estructura secundaria de un polipéptido y puede, en algunos casos, ser un artificio *in vitro* (Scandalios and Sorenson, 1977). Las modificaciones sobre las primeras sirven para identificar grupos, cultivares, especies de plantas o animales.

Las aloenzimas son los diferentes loci que codifican para cada isoenzima. Las diferencias de movilidad o la presencia-ausencia de una banda de una aloenzima sirve para identificar cultivares de plantas y, así, utilizarlos como marcadores genéticos (Oliver and Martinez-Zapater, 1985).

En papa se han caracterizado y diferenciado numerosos cultivares por esta metodología. Las isoenzimas que más discriminan entre cultivares son: malato deshidrogenasa (MDH, E.C. 1.1.1.37); glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.3) y alcohol deshidrogenasa (ADH, E.C. 1.1.1.1).

Se han reportado tres isoenzimas, A, C y D, para MDH en papa (Oliver and Martinez-Zapater, 1985). La A está formada por 2 subunidades, las cuales tienen 3 aloenzimas. La C y la D tienen, cada una, 2 aloenzimas diferentes.

ADH tiene dos isoenzimas, A y B (Oliver and Martinez-Zapater, 1985). La forma A tiene tres aloenzimas, mientras que la B tiene cuatro. Ambas isoenzimas están formadas por dos subunidades y se encuentran en el citosol.

GDH tiene solo una isoenzima, la A, con tres diferentes aloenzimas (Oliver and Martinez-Zapater, 1985). También está formada por dos subunidades.

Solo se han reportado variaciones epigenéticas en la isoenzima D de MDH (Oliver and Martinez-Zapater, 1985).

PCR y RAPD´s

PCR, del inglés *polymerase chain reaction*, es un método para amplificar *in vitro* ADN en forma exponencial (Thomas, 1993). El proceso requiere un templado de ADN, un par de oligonucléotidos, la ADN-polimerasa y un aparato que permita la incubación de todos estos reactivos a tres o más temperaturas diferentes (ciclador). El proceso en sí se centra en el uso de una polimerasa termoestable que no se desnaturaliza a temperaturas mayores a los 80°C. Los primers son específicos para una secuencia seleccionada del templado.

La mezcla de reacción conteniendo todos los componentes antes citados se incuba a 94°C en un ciclador. El objetivo de este primer ciclo es desnaturalizar el templado de ADN. Luego, la mezcla es enfriada para favorecer la unión del primer al templado. La temperatura se lleva a 72°C para la replicación del ADN. Esta temperatura es la óptima para la TAQ ADN polimerasa. La misma comienza a sintetizar una copia del ADN a partir de los primers. Durante este segundo ciclo el ADN sintetizado crece hasta que la temperatura aumenta para favorecer la apertura de las cadenas y permitir que todo el proceso vuelva a repetirse. Después de 20 a 30 ciclos el producto de la reacción puede ser visualizado por medio de una electroforesis en agarosa y teñido con bromuro de etidio.

Los RAPD´s, del inglés *randomly amplified polymorphic DNA*, es la amplificación de segmentos de ADN tomados al azar. Los primers utilizados son de 10 pares de bases con secuencias específicas que se pegan al azar en diferentes partes del ADN. El patrón de bandas que se logra puede ser utilizado para comparar ADN´s de diferentes orígenes y determinar si son iguales (Beer et al., 1993). Además,

el método es accesible, rápido y reproducible. La correlación entre las diferencias genotípicas y los RAPD´s es alta (Beer et al., 1993).

Los objetivos del presente ensayo fueron la identificación y caracterización del clon 150 como un cultivar genéticamente diferente al cultivar Kennebec por diferentes metodologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis isoenzimático:

Extracción de las enzimas (basado en el método de Scandalios, 1969, modificado):

Los extractos se realizaron con plantas de ambos clones (T y 150) provenientes del cultivo *in vitro* en medio de multiplicación (Marconi, 1992).

Para la medición de ADH se realizó un pre-tratamiento anaeróbico con plantas de ambos clones para estimular la síntesis de la misma. La anaerobiosis se provocó con el agregado de agua sobre el medio de cultivo, tal que las plantas quedaran sumergidas dentro de los frascos por 48 hs. La parte aérea y la raíz fueron molidas por separado en el buffer Tris-cítrico (pH:8.00), 2-β mercaptoetanol 14 M, y 1% de PVP (polivinil pirrolidona) a 4°C.

Protocolo para los Geles de Almidón

El gel de almidón al 12 % fue preparado con 36 g de almidón de papa deshidratado (Sigma) en 300 mL de buffer corrida: Tris-cítrico (pH 8.00). La mezcla se calentó lentamente sobre un mechero Bunsen hasta el punto de pre-ebullición. El líquido caliente fue aspirado con una bomba de vació para desgasearlo. Luego se volcó sobre un molde de 20X20X0,8 cm para el enfriado y moldeado del mismo.

Los extractos fueron cargados en papeles de 0,5X0,5 cm (Schleicher and Schuell, 2943). Los mismos fueron sembrados en ranuras hechas sobre el gel de almidón. Las condiciones de la corrida fueron: 210 Volts (corriente constante) por 3,30 hs a 5,30 hs, según la corrida, y a 4 C. Luego de la electroforesis se reveló para las siguientes enzimas: malato deshidrogenasa (MDH), glutamato deshidrogenasa (GDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH) (Scandalios, 1969).

RAPD:

Aislación del ADN genómico (basado en el método de Saghai-Maroof et al, 1994 modificado):

Las plantas de ambos clones (T y 150) de papa multiplicadas *in vitro* fueron utilizadas para la aislación del ADN genómico. Estas fueron sumergidas en nitrógeno

líquido para la molienda del tejido (300 a 400 mg). Una vez disgregado todo el material vegetal se agregó buffer CTAB, 2-β mercaptoetanol 14 M y 1% de PVP (polivinil pirrolidona). El material fue incubado por 10 minutos a 65°C en un agitador de inversión suave. Luego se lo pasó a un baño de 60°C por 70 minutos. Al término de ese tiempo se agregó medio volumen de cloroformo:octanol en agitación suave. Se centrifugó el material a temperatura ambiente 3000 r.p.m. por 15' (Eppendorf). El sobrenadante se extrajo con cuidado y se volvió a repetir todos los pasos de extracción.

El sobrenadante extraído se incubó con RNAasa H 10 X (Promega) durante 30' a temperatura ambiente. Luego se le agregó un volumen de isopropanol en forma circular y agitando. El ADN envuelto en la punta de una pipeta Pasteur se introdujo en etanol al 76 % con acetato de sodio 0.2 M durante 20' a temperatura ambiente para su lavado. Este proceso se realizó una vez más y luego se dejó secar el ADN a temperatura ambiente.

Por último, el ADN aislado se lo redisolvió en buffer TE 1X.

Cuantificación y control de calidad:

El ADN debe ser de alto peso molecular y lo menos degradado que sea posible. Para ello se debe obtener una banda apretada de más de 40 Kb en un gel de agarosa. Para determinar el estado y cantidad de ADN obtenido se realizaron 3 diluciones del mismo (y de cada clon) según 25, 50 y 100 % para sembrarlo en gel de agarosa al 0,7 %. Además se sembró un marcador de peso molecular (λ no cortado). El gel fue corrido a 50 mA por 90'. Por comparación de intensidad de bandas se pudo determinar que la concentración del ADN en ambos clones fue la misma y de 800 μg μL^{-1} (Fig 5-1).

Protocolo para el RAPDs:

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: $ClMg_2$ (50 mM), 2.5 mM; mezcla dNTP (250 μM c/u), 10 μM de c/u; TAQ DNA pol (Promega) 1U, buffer amortiguador para la TAQ, 1 X; DNA, 5 ng μL^{-1}. Se utilizaron los decámeros de oligonucleótidos de las series OPA-OPB-OPC-OPD (Kit de Operon, Alameda, CA. USA), 8 μL μL^{-1} La

reacción se llevó a cabo en un ciclador capilar (air-termocycler-160S-Idaho Technology). Para amplificar se utilizó el siguiente programa: 94°C por 26"; 45 ciclos a 93°C por 5", 72°C por 1'45" y 36°C por 20"; el último ciclo fue a 72°C por 10'. Finalmente los productos de la reacción se resolvieron en un gel de agarosa al 2 %, corrido en buffer TBE a 4,5 V/cm por 100 minutos y coloreado con bromuro de etidio (Rasmussen and Rasmussen, 1995). En todas las corridas se utilizó un blanco que contenía toda la mezcla de reacción pero con el agregado de agua en lugar de ADN.

RESULTADOS

Para MDH se pudo observar diferencias entre ambos clones en los patrones de bandas (Fig. 5-2). También se encontraron diferencias con las plantas que habían sido pre-tratadas. De acuerdo a la movilidad de las aloenzimas se pudieron diferenciar tres zonas. En la zona correspondiente a las bandas anodales, existieron diferencias entre ambos clones para el vástago de las plantas no pre-tratadas; siendo la banda del clon 150 la más rápida. En la zona intermedia hubo diferencias de movilidad entre ambos clones para las raíces de las plantas pre-tratadas. Por último, en la zona de siembra se observaron diferencias entre los clones para las raíces de plantas no pre-tratadas (misma figura).

Para ADH y GDH se habían encontrado diferencias entre ambos clones (Fig. 5-2B y 3). Sin embargo, los resultados fueron variables. En las primeras corridas se encontraron diferentes patrones para las diferentes fracciones y clones, pero en las repeticiones sucesivas del experimento dichas diferencias desaparecieron. Este fenómeno se puede interpretar como un falso positivo debido a la contaminación de la fracción aérea con fracción de raíz por la presencia de raíces adventicias (misma figura). Los resultados hallados no permitieron diferenciar los clones. La ADH solo se expresa en la raíz y la mayor actividad se observó en las plantas pre-tratadas (misma figura).

Cuando se realizaron los análisis por RAPD's se observaron diferencias entre ambos clones. El primer OPB-13 marcó las diferencias intraespecíficas entre ambos clones (1,25 %). El patrón de la corrida se mantuvo luego de cuatro repeticiones independientes (Fig. 5-4). La banda presente en el clon Kennebec y ausente en el 150 tiene 840 Kb (aprox.) y fue aislada para futuros análisis.

CONCLUSIONES

Las diferencias observadas por el análisis isoenzimático solo revela diferencias de movilidad de las bandas. No se han encontrado diferencias en el número de subunidades conformacionales de las enzimas en estudio. A través del análisis de MDH se puede observar las diferencias entre ambos clones.

Los RAPD's permitieron diferenciar ambos clones por un patrón de pequeños segmentos de ADN amplificados que solo se encontró en el clon T. La ausencia de la banda en el clon 150 corrobora los resultados hallados por las isoenzimas.

La plantas regeneradas muestran alteraciones de base génica. Este resultado apoya la consideración de que en las mismas han ocurrido eventos mutacionales múltiples en la línea celular que originó el clon 150 durante la fase de cultivo *in vitro*. De acuerdo con esto, se descarta que las variaciones observadas se deban a alteraciones epigenéticas. (ver discusión).

Figura 5-1: Cuantificación y control de calidad para el ADN del clon T (líneas 2, 3 y 4) y clon 150 (líneas 5, 6 y 7) a tres diluciones diferentes 25% (líneas 2 y 5), 50% (líneas 3 y 6) y 100% (líneas 4 y 7). La línea 1 es el ADN del fago λ sin cortar.

Figura 5-2: Patrón isoenzimático para MDH (A) y ADH (B).(sistema Tris-Cítrico. pH: 7.00) de los dos clones en estudio: T (líneas 1, 4, 5 y 8) y 150 (líneas 2, 3, 6 y 7); Raíz (líneas 3, 4, 7 y 8), vástago (líneas 1, 2, 5 y 6); con pre-tratamiento anaeróbico (5, 6, 7 y 8)

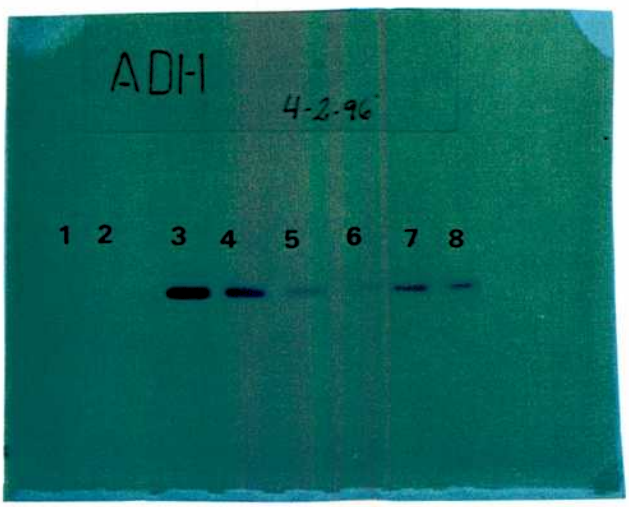


Figura 5-3: Zimograma revelado para GDH. Líneas 5, 7y 9: clon T; 4, 6 y 8: clon 150; para vástago (4 y 5) y raíz (6, 7, 8 y 9).

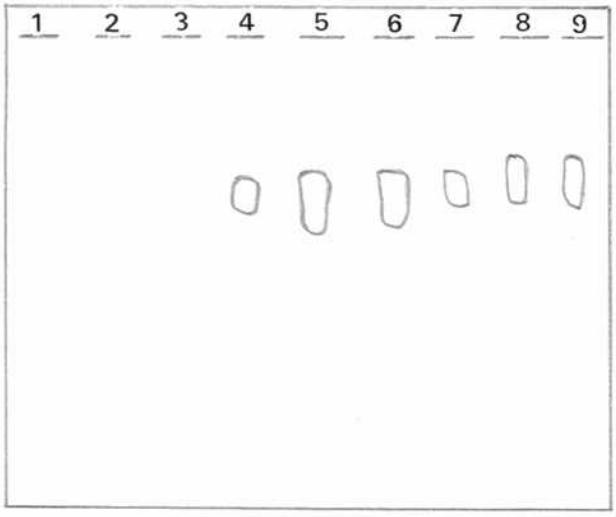
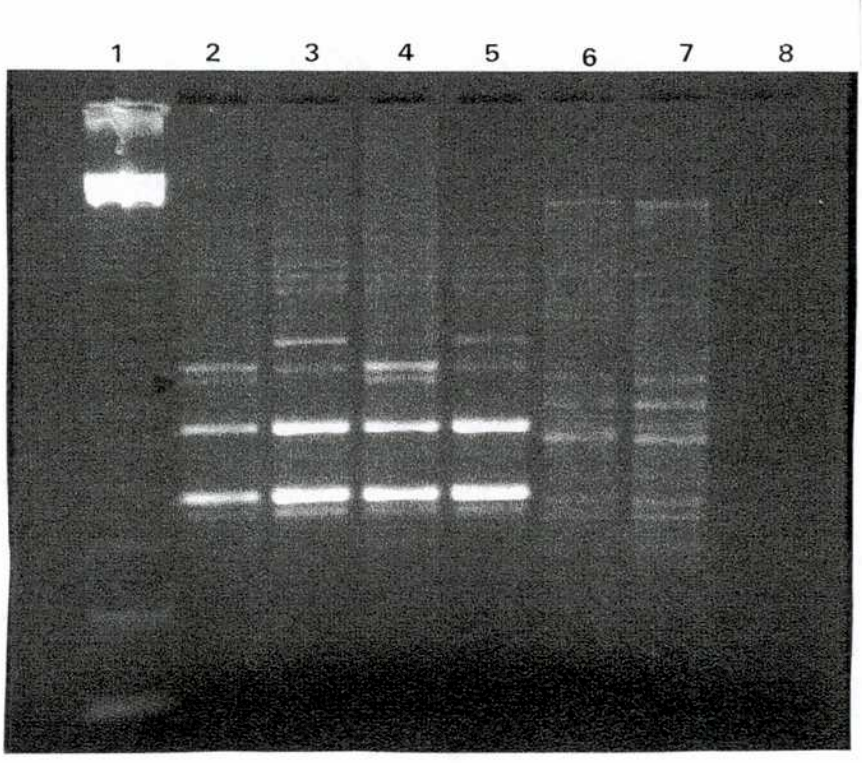


Figura 5-4: Polimorfismos (PCR-RAPD) obtenido para los clones 150 (3, 5 y 7) y T (2, 4 y 6), para los primers OPB13 (2, 3, 4 y 5) y OPB4 (6 y 7). La línea 1 corresponde a un marcador de peso molecular (cada banda indica 123 Kb). La línea 8 representa el T. La flecha indica la diferencia polimórfica.



La gran difusión del cultivo de la papa sugiere que esta especie posee una alta capacidad de adaptación a variadas condiciones ambientales. Sin embargo, esta afirmación es exacta solo si se refiere a la especie *Solanum tuberosum*, por que en la práctica las diversas variedades comerciales tienen comportamientos diferentes. La plasticidad de cada variedad, compatible con el mantenimiento de sus características agronómicas, es, en verdad, mínima. La propagación por vía asexual acentúa la conservación del acervo genético intacto a través de numerosas generaciones. Debido a ello los planes de mejoramiento de la papa suelen centrarse en tecnologías no tradicionales.

En los últimos veinte años la biotecnología ha progresado al punto de lograr el mejoramiento de algunas plantas a condiciones de estrés, particularmente del tipo biótico. Algunas de estas plantas ya están siendo comercializadas y son aptas para el consumo humano (AgrEvo, 1996). Sin embargo, la obtención de variedades tolerantes a formas de estrés abiótico mediante técnicas de la biología molecular es aún hoy limitada. Esto se debe a que la tolerancia a cierto tipo de estrés abiótico suele ser el resultado de la expresión de numerosos genes expresándose en un orden jerárquico.

A partir de los avances de la biología molecular, la variación somaclonal ha sido relegada y han aparecido numerosos trabajos donde se pone en duda su eficacia. Las principales desventajas que presenta son: la pérdida o imposibilidad de regeneración de los callos; la adaptación epigenética, la cual puede ser confundida con una mutación; y la pérdida de una correlación entre la tolerancia a nivel celular respecto de la planta entera (Tal, 1996). Flowers et al. (1985), Dracup (1991) y Munns (1993) invalidan la metodología por encontrar una falta de correlación entre la tolerancia que puedan ejercer las células *in vitro* respecto de una planta regenerada. Franzone y colaboradores (1996) encontraron una mayor estabilidad genética en el cultivo *in vitro* respecto de *in vivo* en tres cultivares de trigo (*Triticum aestivum).* Sin embargo, la variación aleatoria inducida por el cultivo *in vitro* sigue siendo, hasta el presente, una de las mejores herramientas para inducir variaciones en el genoma de cultivos como la papa cuyo mejoramiento por la metodología clásica es dificultoso.

En la presente Tesis se han acumulado evidencias que sugieren que las plantas del clon 150 son génica, fisiológica y metabólicamente diferentes a las del cultivar de origen. Sin embargo, ha sido durante el cultivo *in vitro* y el desarrollo de las técnicas de selección recurrente con ClNa que se generaron tales mutaciones? Probar que el cultivo *in vitro* ha sido el inductor de los cambios genéticos hallados ha quedado fuera del alcance de esta Tesis.

Los cambios genéticos ocurridos en la línea 150 podrían implicar cambios y/o reordenamientos de ciertos genes. Aunque, también podrían deberse a cambios que afecten la expresión a nivel transcripcional, o post-transcripcional, así como también a nivel post-traduccional. El hecho de que se observen cambios en el patrón de corrida de los RAPDs, de que dos isoenzimas (MDH y GDH) presenten distinta movilidad electroforética y el que se hayan observado cambios morfológicos estables en el color de la piel y pulpa de los tubérculos y de las flores, así como también cambios fisiológicos; sugiere que los cambios sufridos por el clon 150 podrían implicar numerosos genes o bien solo uno o unos pocos genes implicados en actividades regulatorias. A partir del patrón de corrida de los RAPDs se puede deducir que una banda de ADN presente en el clon T, y que debería amplificarse a partir del primer OPB13 no se observa, al menos en igual posición, en el clon 150. Esto sugiere diferencias génicas entre clones. Además, a partir de las corridas con isoenzimas no se observó un aumento del número de copias de los alelos en estudio, lo cual descartaría rearreglos cromosómicos tales como aneuploidías o poliploidias. Por el contrario, solo se observaron cambios en la movilidad de las bandas de las isoenzimas. Esta observación provee fundamento a la idea de que los cambios genéticos afectarían la actividad de ciertas proteínas.

La mayor resistencia a elevadas concentraciones de ClNa es uno de los caracteres que mejor permite distinguir los cambios fisiológicos sufridos por el clon 150 respecto del clon T. La resistencia al ClNa se manifiesta a nivel de planta entera como la posibilidad de mantener el crecimiento y completar en forma normal el ciclo ontogénico aún a altas concentraciones de ClNa externo. A partir del Capítulo 1 la mayor resistencia exhibida por las plantas del clon 150, respecto del clon T, a elevadas concentraciones de ClNa parece involucrar al menos dos mecanismos

fisiológicos: diferente efecto tóxico del Na^+ en el metabolismo celular y diferencias en las relaciones hídricas por una mayor acumulación de iones inorgánicos no determinados o por una mayor síntesis de compuestos osmocompatibles. El cultivo de las plantas de ambos clones por un período prolongado en elevadas concentraciones de ClNa provocó la disminución relativa de la producción de materia seca respecto del tratamiento control. Como consecuencia de ello el clon T redujo la tasa de crecimiento, por una disminución relativa de la tasa de asimilación neta de las plantas y una reducción relativa del área fotosintetizante. Estos dos efectos pueden haber sido la resultante de la acumulación de Na^+ y/ó Cl^- en las plantas. Ambos iones pueden afectar los distintos componentes de la fotosíntesis, así como, la partición de asimilados entre distintos órganos de las plantas. Los efectos tóxicos de la alta concentración de Na^+ en el metabolismo celular pueden deberse al desplazamiento o competencia de este ion con, principalmente, K^+ y Ca^{++}. La primer sustitución suele afectar la actividad de numerosas enzimas que utilizan al K^+ como cofactor. El desplazamiento del Ca^{++}, en tanto, genera una desorganización en las membranas celulares, lo cual, a su vez, puede inducir la pérdida de K^+ entre otros electrolitos (Cramer et al., 1985, Greenway and Munns, 1980).

Además, a partir de los resultados de este capítulo se observó un aumento en la concentración de K^+ pero con una mayor disminución relativa del RGR en las plantas del clon T respecto del 150. Este resultado, en apariencia contradictorio, sugiere cambios en el control de la acumulación de Na^+ y de K^+ en el clon 150. La menor acumulación de Na^+ permitiría a las plantas del clon 150 escapar de los efectos tóxicos. Esto, sumado a la posible acumulación de compuestos osmocompatibles, debería impedir la merma del crecimiento por efectos osmóticos. El clon 150, no obstante presentó una mayor acumulación relativa de agua. Recientemente varios laboratorios han citado la existencia de transportadores de alta afinidad de K^+ (Santa María et al., 1997). Estos transportadores también podrían mediar en la entrada de Na^+ como un sistema de baja afinidad y permitirían la mayor acumulación de este ion.

El aumento de las enzimas involucradas en el ciclo ascórbico-glutatión y de SOD, el aumento de la concentración de ácido ascórbico, así como también la reducción en la concentración de clorofila total en las hojas de las plantas del clon T sugiere que elevadas concentraciones de ClNa pueden inducir la producción de radicales libres en las células. Si las especies reactivas del oxígeno aumentan en forma descontrolada producen un estrés oxidativo en las plantas. La producción de los radicales libres puede desencadenarse a partir del efecto tóxico del Na^+ sobre las membranas celulares (Hernandez et al., 1993). Sin embargo, la ausencia de peroxidación lipídica, así como también la actividad constante de la lipoxigenasa a elevadas concentraciones de sal en ambos clones, parece descartar este origen. Los resultados sugieren un efecto tóxico del Na^+ sobre otros compuestos celulares cuya oxido-reducción genera radicales libres. Las plantas disponen de medios de protección contra éstos, lo que constituye un mecanismo de defensa antioxidante. Este mecanismo de defensa parece ser constitutivo en las células del clon 150; está activo y actúa aún a bajas concentraciones de sal y, por lo tanto, a una concentración de radicales libres baja. Cuando las plantas son expuestas a concentraciones mayores de sal, con la subsiguiente generación de poder oxidativo, las plantas del clon 150 neutralizarían dicho efecto más rápido que las del clon T. Las plantas del clon T tienen el mismo mecanismo de defensa constituido por los mismos agentes antioxidantes. Sin embargo, la respuesta antioxidante debe ser inducida a partir de la generación del estrés. Este mecanismo retarda la velocidad de la respuesta lo cual permite que los radicales libres generados comiencen una reacción en cadena de oxidaciones y reducciones. Este proceso desencadena un desequilibrio en el metabolismo celular acentuando el efecto tóxico del Na^+ y con el consiguiente impacto sobre el RGR.

El estudio comparativo, entre el nivel de callo y planta entera, fue realizado con el objetivo de determinar si la resistencia al ClNa se encuentra asociada a características que actúan solo a nivel de planta entera, o bien, pueden actuar a nivel de células no diferenciadas. Al igual que en los sistemas de planta entera, los resultados del análisis de crecimiento fueron diferentes entre clones en todo el gradiente de ClNa. El crecimiento de los cultivos de callos fue mayor en el clon 150

que en el T. La disminución del RGR, en los cultivos de callos del clon T a elevadas concentraciones de ClNa, pudo ser el resultado del efecto tóxico provocado por el aumento de la concentración de Na^+. Este resultado coincide con las observaciones realizadas en el Capítulo 1 para el sistema de planta entera. Además, las células de los callos del clon 150 disminuyeron la concentración de Na^+ y aumentaron la relación K^+/Na^+ respecto de los del clon T.

El aumento de la concentración externa de ClNa provocó el aumento de la actividad oxidante en los callos de ambos clones. A diferencia del sistema de planta entera, la actividad oxidativa pudo haber comenzado por el efecto tóxico del Na^+ sobre las membranas celulares. El contacto de este ión con los ácidos grasos de las membranas puede provocar una serie de reacciones de oxido-reducción. La consecuencia de ello es el aumento tanto de la peroxidación lipídica como de la concentración de especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, los mecanismos antioxidantes que operan a nivel de callo son complejos y múltiples. En los ensayos del Capítulo 4 solo se midieron los compuestos y enzimas que intervienen en el ciclo glutatión-ascórbico. A partir de estos resultados no se pudo extraer una conclusión sobre el mecanismo de defensa antioxidante que operó en los cultivos de callos de ambos clones.

Las diferencias observadas en el laboratorio pudieron corroborarse a campo. Entre las diferencias observadas, la coloración de los tubérculos del clon 150 parece ser la más llamativa. El color rojizo de la piel y la pulpa de los mismos puede estar relacionada con una alta producción de antocianas. En numerosos trabajos las antocianas han sido citadas como parte de la defensa antioxidante de las plantas (Ishii et al., 1996). Si el clon 150 ha desarrollado un sistema antioxidante más eficiente que el del clon T podría ser motivo de posteriores estudios el mecanismo antioxidante de estas moléculas y las posibles implicancias en la tolerancia al estrés salino. Además, el incremento del número de tallos principales y secundarios en las plantas del clon 150 puede ser la consecuencia del mayor número de tubérculos observados en este clon respecto del T. Sin embargo, la disminución del peso en las fracciones de mayor tamaño puede ser el resultado de un diferente patrón de desarrollo del clon 150 respecto del T. Esto también pudo ser observado en los

parámetros fisiológicos medidos en los tubérculos, tales como el período de dormición y senescencia.

Los trabajos realizados en la presente Tesis permiten concluir que: el clon 150 difiere génica y genéticamente del clon T; tales diferencias involucran una mayor tolerancia a concentraciones externas elevadas de ClNa; tal tolerancia podría al menos deberse, a la menor acumulación de Na^+ y una mayor retención de agua en los tejidos. Además, a quedado demostrado que el efecto de elevadas concentraciones de ClNa genera un estrés oxidativo. La respuesta antioxidante difiere entre ambos clones, tal respuesta constituye un evento temprano y su incidencia sobre el crecimiento podría ser importante. Algunas de las características que confieren resistencia al clon 150 han podido observarse a nivel de callos.

Hasta ahora se conocen las posibilidades del clon 150 al nivel de laboratorio e invernáculo o cámara de cultivo. A campo se ha llevado un estudio preliminar donde quedaron de manifiesto las diferencias fenotípicas halladas en los estudios previos. Queda mucho por investigar sobre el rendimiento del cultivo en suelos salinos, las posibles cualidades agronómicas de este cultivo y las posibles implicancias económicas del mismo.

BIBLIOGRAFIA

AgrEvo, 1996. The Glufosinato selective project. Folleto de divulgación técnica. AgrEvo Corporate Communication. Frankfurt, Germany.

Ahmad, S. (1995). Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Ed. Ahmad, S. Chapman and Hall, New York, Paris, Toronto. pp 457.

Anderson, M E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol. 113:548-545 .

Ayers, A and Shepard, J. (1981). Potato variation. Envaronm. and Exp. Botany 21 (3/4): 379-381.

Bajaj, Y. (1986). Biotechnology in agricultural and forestry. Trees I-III. Ed. Bajaj, Y. Springer-Verlag. Pp 622.

Bajaj, Y. (1987). Estrés oxidativo como consecuencia del estrés salino. En: Potato. Ed. Bajaj, Y. Springer-Verlag. pp

Becana, M, Aparicio Tejo, P, Irigiyen, J, y Sanchez-Diaz, M. (1986). Some enzyme of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. Plant Physiol. 82: 1169-1171.

Beer, S, Goffreda, J, Phillips, J, Murphy, J and Sorrels, M. (1993). Assessments of genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits, isozymes and RFLPs. Crop Sci., 33: 1386-1393.

Blum, A, Munns, R, Passioura, J and Turner, N. (1996). Letters to the Ed.: Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: how to interpret osmotic relations? Plant Physiol. 110: 1051-1053.

Bohnert, H, Golldack, D, Ishitani, M et al. (1996). Salt tolerance engineering requires multiple gene transfer. Engineering Plant for Comm. Prod. Appl., N Y Academy of Sc., 792: 115-125.

Bohnert, H, Nelson, D and Jensen, R. (1995). Adaptation to environmental stress. The Plant Cell. 1099-1111.

Bonierbale, M, Ganal, M and Tanksley, S. (1990). Applications of restriction fragment length polymorphism and genetic mapping in potato breeding and molecular genetics. Ed. Vayda, M. and Park, W. In: The molecular and cellular biology of the potato. CAB International. UK. pp. 259.

Bouma, T and De Visser, R (1993). Energy requirements for maintenance of ions concentrations in roots. Physiol. Plant. 89: 133-142.

Brown, C. (1990). Modern evolution of the cultivated potato gene pool. In: The molecular and cellular biology of the potato. Ed. Vayda, M. and Park, W. CAB International, Wallingford, UK. pp. 258.

Cacace, J, Huarte, M and Minti, C. (1992). Evaluation if potato cooking quality in Argentina. Am. Pot. J. 71: 145-153.

Catálogo Holandés de Variedades de Papa. (1994). NIVAA, Den Haag, CEPRO-DLO, Eageningen, Holanda.

Caldiz, D O. (1988). Períodos de dormición, brotación e incubación de tres nuevas variedades de papa obtenidas por el INTA. Hort. Arg., 7(15) : 16-19.

Caldiz, D O. (1990). Influence of origin and storage system on physiological age, crop growth and tuber yield of seed potato (*Solanum tuberosum*). Indian J Agric. Sc. 61(1): 1-6.

Caldiz, D O. (1994). Genetic improvement and associated physiological changes in potato. En: Genetic improvement of field crops. Ed. G A Slafer. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel-Hong Kong. Chapter 8.

Causton, D (1991). Plant growth analysis: the variability of relative growth rate within a sample. Annals of Botany 67: 137-144.

Chaleff, R. (1983). Isolation of agronomically useful mutants from plant cell culture. Science, 219: 676-682.

Chadler, S and Thorpe, T. (1986). Variation from plant tissue culture: biotechnological applications to improving salinity tolerance. Biotech. Adv., 4: 117-135.

Chance, B H, Sies, H and Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev. *59*:527-605 .

Chávez, R, Mendoza, H y Espinoza, J. (1995). Mejoramiento de batata para adaptación a suelos salinos y áridos. Circular del CIP, Vol. 21, n° 2: 2-7.

Chen, Y, Miles, A and Grishan, M. (1995). Pathophisiology and reactive oxygen metabolites. In Oxidative stress and antioxidant defense in biology. Ed. Ahmad, S. Chapman and Hall, pp. 456.

Circular C.I.P. (1986). Centro Internacional de la Patata. 14: 6-8.

Corpas, F, Gómez, M, Hernández, J and del Río, L. (1993). Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride. J. Plant Physiol. 141: 160-165.

Cramer, G, Läuchli, A and Polito, V. (1985). Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? Plant Physiol. 79: 207-211.

Cramer, G, Läuchli, A and Epstein, E (1986). Effects of NaCl and $CaCl_2$ on ion activities in complex nutrient and root growth of cotton. Plant Physiol. 81: 792-797.

Dalton, D. (1995). Antioxidant defense of plants and fungi. In: Oxidative stress and antioxidant defense in biology. Ed.: Ahmad, S. Chapman and Hall, NY, Bon, Boston, London, Madrid. 298-336.

Dalton, D A, Langeberg, L and Treneman, N (1983). Correlation between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. Physiologia Plantarum 87: 365-370.

Davies, T. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Free radicals and oxidative stress: environmental, drugs and food additives. The Biochemical Society, London.

Del Longo, O, Gonzalez, C, Pastori, G and Trippi, V S. (1993). Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. Plant Cell Physiol. *34*(7): 1023-1028.

Dracup, M (1991). Increasing salt tolerance of plat thought cell culture require greater understanding of tolerance mechanisms. Australian J Plant Physiol. 18: 1-15.

Epstein, E (1972). Mineral nutrition of plants:principles and perspectives. John Wiley and Sons, NY.

Epstein, E and Rains, D .(1987). Advances in salt tolerance. Genetics Aspects of plant mineral nutrition. Ed. H W Gabelman and B C Loughman. Martinus Nijhoff, Dordrech, Boston, Lancaster. 113-125.

Flowers, T, Lachno, D, Flowers, S and Yeo, A. (1985). Some effects of sodium chloride on cells of rice cultured *in vitro.* Plant Sc. 39: 205-211.

Franzone, P, Suarez, E, Favret, E, Rios, R and Paleo, A. (1996). Somaclonal variation in three Argentinean varieties of *Triticum aestivum* with different karyotypic instability. Plant Breading, 115: 2.

Gallego, Susana. (1997). Daño oxidativo en vegetales producido por metales pesados. Tesis de doctorado presentada en la FFyB de la UBA.

Garciagustin, P and Primomillo, E. (1995). Selection of a NaCl-tolerant citrus plant. Plant Cell Reports, 14 (5): 314-318.

Gossett, D R, Millhollon, M et al. (1994). The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports *13*: 498-503.

Gossett, D, Banks, S, Millhollon, P and Cran Lucas, M. (1996). Antioxidant response to NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione. Plant Physiol. 112: 803-809.

Gotlieb, L. D. (1982). Conservation and duplication of isozymes in plants. Science 216 (23): 373-380.

Heath, R.L. and L. Packer.(1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys. *25*:189-198.

Hernandez, J, Del Río, L and Sevilla, F. (1993). Salt stress-induced changes in superoxide dismutase in leaves and mesophyll

Hernadez, J, Corpas, F, Gomez, M, del Rio, L and Sevilla, F. (1993). Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. Physiol. Plant. 89: 103-110.

Hernandez, J, Olmos, E, Corpas, F et al. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. Plant Sc. 105: 151-167.

Hoagland, D R and Arnon, D I. (1957). California Agriculture Experiment Station. Circular 347.

Hunt, J. (1982). Dilute hydrochloric and extraction of plant material for routine cation analysis. Comm. In Soil Sc. Plant Anal., 13(1), 49-55.

Ishii, G, Mori, M and Umemura, Y. (1996). Antioxidative activity and food chemical properties of anthocyanins from colored tuber flesh of potatoes. J. Jap. Soc. for Food Sc. And Techn. 43: 8, 962-966.

Jablonski, P and Anderson, J W. (1981). Light-dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts. Plant Physiol., 69: 1407-1413.

Jacobs, M, Negritiu, I, Dirks, R and Cammaerts, D. (1987). Selection programs for isolation and analysis of mutants in plant cell cultures. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, Inc. 243-264.

Jacoby, B. (1990). Mechanism involved in salt tolerance by plants. Ed. Pessarakli, M. In: Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, Inc. N Y, Basel, Hong Kong. 97-125.

Jaffé, W and Rojas, M. (1994). Abiotic stress and biotechnology in Latin America. Biotech. and Devel. Monitor. 18: 6-7.

Kinsbury, R, Epstein, E and Pearcy, R. (1984). Physiological responses to salinity in selected lines of wheat. Plant Physiol.. 74: 417.-423.

Larkin, P and Scowcroft, W. (1981). Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197-214.

Loomis, W (1969). Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. Methods in enzymology Vol. 13: 555-563.

Lowry, H O, Rosebrough, N, Farr, A and Raudallo, R. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J Biol. Chem. *193*:265-275.

Luna, C M, Gonzales, C y Trippi, V S (1994). Oxidative damage caused by an excess Cu on oat leaves. Plant and Cell Physiol. 35: 11-15.

Mandolino, G, Demarco, S, Faeti, V et al. (1997). Stability of fingerprints of *S. tuberosum* plants derived from conventional tubers of vitrotubers. Plant Breeding 116 (6): 349-444.

Marconi, P L (1992). Seminario para la Licenciatura. FCEyN-UBA.

Marconi, P L, Radice, S y Caso, O. (1992). Respuesta de dos clones de *Solanum tuberosum* (cv. Kennebec) cultivados bajo condiciones de estrés. XIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Córdoba, Marzo de 1992.

Medina, E. (1977). Introducción a la ecofisiología vegetal. Serie de Biología, monografía n° 16. OEA, Washington. pp. 102

Milbourne, D, Meyer R, Bradshaw, J et al., (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potatoes. Molecular Breeding, 3(2): 127-136.

Miller, S and Lipschutz, L. (1984). Handbook of plant cell culture III. Crop species. Ed.: Amirato, P and Yamada, Y. Mac Millan. 291-265.

Mishra, N, Mishra, R and Singhal, G. (1993). Change in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. Plant Physiol. 102: 903-910.

Monk, L S and Davies, H V (1989). Antioxidant status of the potato tuber and Ca^{2+} deficiency as a physiological stress. Physiol. Plant, 75: 411-416.

Morpurgo, R (1991). Correlation Between Potatoes Clones Grown *in vivo* and *in vitro* Under Sodium Chloride Stress Conditions. Plant Breeding 107,80-82.

Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. Plant, Cell and Environmental, 16: 15-24.

Munns, R, Greenway, H and Kirst, G. (1983). Halophytes: algae and higher plants. In: O. L. Lange and B. Osmond, eds., Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Vol. 12C. Springer-Verlag, Berlin, pp. 90-134.

Munns, R , Schachtman, D and Condon, A. (1997). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. Austr. J. Plant Physiol. 24 (4): 561-569.

Murashige, T and F Skoog (1962). A reviser medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum 15: 473-497.

Nakano, Y. and T. Asada. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol. *22(5)*:867-880.

Niu, X, Bressan, R, Hasegawa, P and Pardo, J. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. Plant Physiol. 109: 735-742.

Ochatt, S. (1996). In Vitro selection for salt/drought tolerance in colt cherry (*Prunus avium X pseudocerasus*). Biotechnology in Agricultural and Forestry, Vol. 36: Somaclonal Variation in Crop Improvement II. Ed. Y P S Bajaj. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 223-238.

Ochatt, S, Marconi, P, Radice, S, Arnozis, P, and Caso, H. (1998). In vitro recurrent selection with potato cultures. Production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, aceptado para su publicación, en prensa.

Oliver, J. and Martinez-Zapater J. (1985). A genetic classification of potato cultivars based on allonzyme patterns. Theor. Appl. Genet. 69: 305-311.

Olmos, E, Hernandez, J, Sevilla, F and Hellín, E. (1994). Induction of several antioxidant enzymes in the selection of salt-tolerant cell line of *Pissum sativum.* J. Plant Physiol.. 144: 594-598.

Paleka, P A. (1985). Recursos Naturales. Cátedra A. Brailovsky. Cuadernillos CBC, EUDEBA.

Peever, T and Higgins, V. (1989). Electrolyte leakage, lypoxigenase and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitor from *Cladosporium fulvum* Plant Physiol. 90: 865-867.

Perez-Alfocea, F and Lerher, F (1995). Effects of phlorizin and p-chloromercuribenzenesulfonic acid on sucrose and proline accumulation in detached tomato leaves submitted to NaCl and osmotic stresses. J Plant Physiol. 145: 367-373.

Perez-Alfocea, F, Santa-Cruz, A, Guerrier, G and Bolarín, M. (1994). NaCl stress-induced organic solutes changes on leaves and calli of *Lycopersicum esculetum* , L. *pennelli* and their interespecific hybrid. J Plant Physiol., 143: 106-111.

Pessarakli, M. (1990). Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, Inc. N Y, Basel, Hong Kong. pp. 697.

Phillips, R, Kaeppler, S and Peschke, V (1990). Do we understand somaclonal variation? In: Progress in plant cellular and molecular biology. Eds.: Nijkamp, H, Van der Plas, L and Van Aartrijk, J. 131-141.

Piqueras, A, Hernandez, J, Olmos, E, Hellín, E and Sevilla, F. (1996). Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. Plant, Cell Tiss. and Org. Cult. 45: 53-60.

Poljiakoff-Mayber, A and Lerner R. (1990). Plants in saline environment. Ed. Pessarakli, M. In: Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, Inc. N Y, Basel, Hong Kong. 65-97.

Porter, H. (1989). Interespecific variation in relative growth rate: on ecological cause and physiological consequence. In: Cause and Consequence of variation in growth rate and productivity of higher plants. De. H. Lambers et al. Academic Publishing. The Netherlands. 45-68.

Potter, R. (1991). Restriction fragment analysis of somaclones. In: Plant, tissue culture manual. Kluwer Academic Press. Netherlands. C5: 1-17.

Rains, D W. (1991). Salinity and alkalinity as an issue in world agriculture. Plant Salinity Research. Ed. R Choukr-Allah. Isesco. Agadir, Morocco. 19-31.

Rasmussen, J O and O S Rasmussen. (1995). Characterization of somatic hybrids of potato by use of RAPD markers and isozyme analysis. Physiol. Plantarum 93: 357-364.

Ryu, D Y and Lee, S (1989). Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. Biotech. Bioeng. 35: 305-311.

Saghai-Maroof, M A, Soliman, K, Jorgensen, R and Allard, R. (1994). Ribosomal DNA spacerlenght polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS, 81: 8014-8019.

Saieed, N, Douglas, G and Fry, D. (1994). Induction and stability of somaclonal variation in growth, leaf and gas exchange characteristics of poplar regenerated from callus culture. Tree Physiol. 14: 1-16.

Salisbury, F and Ross, C. (1995). Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Lationoamericana. México D.F. pp. 758.

Santa María, G, Rubio, F, Dubcovsky, J and Rodriguez Navarro, A. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. The Plant Cell, Vol. 9, 2281-2289.

Sasson, A. (1990). Effects of climatic variation on production. In: Feeding tomorrow's world. UNESCO, France. pp. 805.

Sasson, A. (1989). Biotechnology and developing countries: present and future. In: Plant Biotechnology's for Developing Countries. Proceeding of an International Symposium, CTA and FAO, 26-30 June, Luxembourg.

Scandalios, J. (1969). Genetic control of multiple forms of enzymes in plants: a review. Bioch. Gen., 3: 37-79.

Scandalios, J and Sorensen, J. (1977). Isoenzimes in Plant Tissue and Organ Culture. Chapter VII. In Applied and fundamental aspects of plant, cell, tissue and organ culture. De. Reinert, J and Bajaj, Y. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberger, N Y. pp. 719-730.

Schaedler, M and Bassham, J. (1977). Chloroplast glutathion reductase. Plant Physiol. 59: 1011-1012.

Schneider, T and Douches, D. (1997). Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. Am. Potato J., 74(3): 149-160.

Schupp, R. and Rennenberg, H (1988). Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.). Plant Science *57*: 113-117.

Scowcroft, W, Brettel, R, Ryan, S et al (1987). Somaclonal variation and genomic flux. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, Inc. 275-286.

Sestak, Z, Castky, J and Jervis, P. (1971). Methods of growth analysis. In Plant photosynthetic production. Manual of Methods. Dr. W Junk, N V Publishiers. The Hague. 443-363.

Seeman, J R and Critchley, Ch (1985). Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behavior and photosynthetic capacity of salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. Planta, 164: 151-162.

Singh, R. (1989). Current status and future prospects of plant biotechnologies in developing countries. En: Feeding tomorrow's world. Ed. A Sasson. UNESCO, France. pp. 805.

Smith, I K, Vierheller, T L and Thorne, C A (1989). Properties and functions of glutathione reductase in plants. Plant Physil., 77: 449-456.

Statistical Graphics Corp. (1992) Statgraphics user's guide. STSC Inc. Rockville, Md.

Szabolcs, Y. (1991). Desertification and salinization. Plant Salinity Research. Ed. R Choukr-Allah. Isesco. Agadir, Morocco. 3-18.

Tal, M. (1996). Somaclonal variation for salt tolerance in tomato and potato. Biotechnology in Agricultural and Forestry, Vol. 36: Somaclonal Variation in Crop Improvement II. Ed.. Y P S Bajaj. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 132-145.

Taleisnik, E and Grunberg, T (1994). Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. Physiol. Plant. 92: 528-534.

Thomas, C. (1993). The polymerase chain reaction. Ed. Dey, P and Harborne, J. In: Methods in plant biochemistry. Academic Press. London, San Diego, N Y, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto. 117-141.

Wattanasiri, C and Walton, P. (1997). Effects of growth regulators on callus cell growth, plant regeneration and somaclonal variation of smooth bromegrass (*Bromus inermis* L.). Euphytica, 69: 77-82.

Wetter, L and Dyck, J. (1992). Isozyme analysis of cultured cells and somatic hybrids. In: Handbook of plant cell culture, Vol. 1. Ed: Evans, D, Sharp, W, Amirato, P and Yamada, Y. Macmillan Publ. Company, NY, London. 907-628.

Winicov, I. (1996). Characterization of rice (*Oriza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. Plant Sc. 113: 105-111.

Wintermans, J.F. and A. De Mots.(1965). "Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol". Biochim Biophys Acta *109*: 448-453.

Wise, R R and Naylor, A W (1987). Chilling enhanced photoxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. Plant Physiol. 83: 278-282.