

Universitat de Lleida

Respuesta de cultivares de patata a la salinidad y potencial efecto protector del metil jasmonato frente al estrés salino

Ricardo Rodríguez Buitrón

Dipòsit Legal: L.886-2015

<http://hdl.handle.net/10803/293375>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Respuesta de cultivares de patata a la salinidad y potencial efecto protector del metil jasmonato frente al estrés salino

Tesis doctoral

Ricardo Rodríguez B.



UNIVERSITAT DE LLEIDA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

Departament d'Hortofructicultura, Botànica i Jardineria

Programa de doctorat Ciència i Tecnologia Agrària i Alimentària

**Respuesta de cultivares de patata a la salinidad
y potencial efecto protector del metil jasmonato
frente al estrés salino**

Memoria presentada por:

Ricardo Rodríguez Buitrón

Para optar al grado Doctor Ingeniero Agrónomo

Directora:

Dra. Ana María Pelacho Aja.

Lleida, septiembre 2014

La presente memoria de Tesis Doctoral titulada “**Respuesta de cultivares de patata a la salinidad y potencial efecto protector del metil jasmonato frente al estrés salino**” es presentada por **Ricardo Rodríguez Buitrón**, estudiante del Departament d’Hortofructicultura, Botànica i Jardineria de la Universitat de Lleida, para optar por el grado de Doctor. La parte experimental se ha realizado en el laboratorio de investigación del Departament d’ Hortofructicultura, Botànica i Jardineria bajo la dirección de la **Dra. Ana María Pelacho**, Catedrática de la Universitat de Lleida, del área de conocimiento de Producción Vegetal de la Escola Tècnica Superior d’Enginyeria Agrària (ETSEA), quien autoriza la presentación de la memoria de Tesis ya que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Dra. Ana María Pelacho Aja
Directora de Tesis

Ricardo Rodríguez B.
Doctorando

Lleida, septiembre del 2014

Dedicatoria:
A mis padres, hermanas, familia y amigos.

Agradecimientos:

En estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en mi trayectoria profesional, y más concretamente, en la culminación de esta Tesis Doctoral. Mis agradecimientos van dirigidos a las siguientes personas:

En primer lugar, mi directora de Tesis Doctoral, la Doctora Ana María Pelacho, le agradezco su tiempo dedicado, paciencia, sensatez y pragmatismo con la que ha abordado las diferentes etapas de esta investigación. Agradezco también al Doctor Lluís Martín-Closas por su colaboración y confianza a lo largo del desarrollo de esta investigación. A todos los miembros del Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería de la Universidad de Lleida por su apoyo y enseñanzas. También quiero agradecer a mis compañeros con los que he compartido el laboratorio, especialmente a Sandra por su apoyo incondicional durante la realización de esta Tesis Doctoral. A mis amigos: Andrea, Marco, Boris, Luis, Desam, Luca, Maite e Iris; sin su ayuda y estímulo que me han proporcionado, esta Tesis Doctoral se hubiera resentido de forma notable. Un especial y reconocido agradecimiento al Dr. Francisco Muñoz por sus sabios consejos e incondicional apoyo en animarme a realizar esta Tesis Doctoral. Debo, asimismo, expresar mi agradecimiento a la Agencia de Cooperación Española AECI por la beca otorgada para la realización de esta Tesis Doctoral.

Finalmente, cómo no, expresar mi más profundo agradecimiento a toda mi familia, que a pesar de estar lejos, han sido parte fundamental para equilibrar la balanza personal y profesional e infundirme el ánimo, cariño y serenidad para poder culminar con éxito este proyecto de mi vida.

Nunca consideres el estudio como un deber, sino como una oportunidad para entrar en el maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein.

RESUMEN

La salinidad es uno de los principales factores que cada vez más limitan la producción agrícola mundial y especialmente en las zonas áridas y semiáridas del planeta. El estrés salino afecta directamente a varios procesos fisiológicos de las plantas, provocando la disminución de su crecimiento, desarrollo y producción. A lo largo de la evolución las plantas han logrado desarrollar diferentes tipos de estrategias para hacer frente al estrés salino. La acumulación de algunos compuestos osmoprotectores en los tejidos, como la prolina, permite a la planta hacer frente a este tipo de estrés. La prolina protege y restaura los procesos fisiológicos y bioquímicos afectados por altas concentraciones de sodio y cloro en el citosol. Este aminoácido osmoprotector ha sido descrito como potencial marcador para determinar la tolerancia a la salinidad y a la sequía en varias especies. Por otra parte, otras respuestas al estrés biótico y abiótico también involucran la actividad antioxidante de enzimas como la catalasa y peroxidasa, enzimas eficaces para evitar la acumulación de radicales libres en los tejidos vegetales. Asimismo, algunas hormonas vegetales, como el ácido salicílico, el ácido jasmónico, el etileno, los brasinosteroides y el ácido abscísico, están relacionadas directamente con la activación de las respuestas de defensa de las plantas. La aplicación exógena de estas hormonas vegetales permiten activar y/o elicitar el sistema de defensa de las plantas para mitigar los daños debidos a la salinidad. En particular y como demuestran los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, el metil jasmonato (MeJa) presenta un efecto estimulante del desarrollo vegetal y protector ante el estrés salino.

El cultivo de patata es el cuarto cultivo en importancia alimentaria a nivel mundial, detrás del maíz, el trigo y el arroz. En los últimos años la producción de este tubérculo se mantiene estable en los países desarrollados, mientras que en los países en desarrollo, donde su interés alimentario es alto y su cultivo era difícil, su producción se ha incrementado rápidamente. Por otra parte, tanto en países desarrollados como en desarrollo el cultivo de patata es afectado por diversos factores, entre ellos, estreses abióticos, como la sequía y la salinidad, los cuales provocan una disminución importante en la producción del tubérculo.

Teniendo en consideración la importancia mundial del cultivo de la patata y los factores abióticos que provocan una disminución de su producción, es necesario la búsqueda y el desarrollo de técnicas o metodologías prácticas que permitan seleccionar y caracterizar cultivares con potencial productivo y tolerantes a condiciones de estrés abiótico como la salinidad.

En este estudio se caracterizaron *in vitro* cuatro cultivares de patata con diferente ciclo de maduración, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac, la caracterización se realizó en base a al desarrollo vegetativo y radical de los explantos. El efecto la aplicación exógena de cinco concentraciones de MeJa (0, 10, 50, 250 y 1250nM) se evaluó sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos. Para determinar la tolerancia de los cultivares de patata al estrés salino, explantos de los cuatro cultivares se expusieron a concentraciones crecientes de salinidad (0, 30, 60, 90 y 120mM), sobre las cuales se evaluó su desarrollo vegetativo y radical. Una vez determinada la tolerancia a la salinidad y el efecto de la aplicación exógena de MeJa, se evaluó el efecto protector del MeJa frente al estrés salino, combinando las concentraciones de NaCl y MeJa en los cuatro cultivares de patata evaluados. La determinación del aminoácido prolina y la actividad enzimática de la catalasa y la peroxidasa se utilizaron como indicadores del grado de tolerancia al estrés salino.

Los resultados obtenidos muestran claramente el efecto negativo de la salinidad sobre el desarrollo de los explantos en todos los cultivares evaluados. La salinidad afectó en mayor grado a los cultivares más tempranos, como Agata, y en menor grado a los cultivares más tardíos, como Kennebec y Red Pontiac. La aplicación exógena de MeJa, permitió incrementar el desarrollo radical y reducir el impacto negativo de la salinidad sobre el desarrollo de los explantos de algunos cultivares de patata. De forma general, las concentraciones entre 50 y 1250nM de MeJa redujeron los efectos negativos de la salinidad en los cultivares expuestos a todos los niveles de salinidad ensayados. El contenido del aminoácido prolina en los explantos aumentó de forma proporcional a las concentraciones de NaCl y fue más alto en los cultivares menos tolerantes a la salinidad respecto a los cultivares con mayor tolerancia al estrés salino.

La actividad enzimática de la catalasa, en el cultivar de patata Kennebec, aumentó con las concentraciones salinas, la aplicación exógena de las concentraciones de MeJa también incrementaron la actividad de esta enzima en todas las concentraciones salinas ensayadas. De forma similar, la actividad de la peroxidasa, en el cultivar Kennebec, también aumentó con las concentraciones salinas evaluadas, y la adición de MeJa al medio de cultivo no tuvo efecto alguno sobre la actividad de la enzima hasta cuando los explantos estuvieron expuestos a un estrés salino de 90 y 120mM donde la adición de MeJa redujo la actividad de la peroxidasa.

Estos resultados sugieren que la técnica de cultivo *in vitro* permite caracterizar cultivares de patata tolerantes al estrés salino así como también evaluar la eficacia de compuestos que aplicados de forma exógena permitan obtener un mayor desarrollo vegetativo y radical y mitigar los efectos negativos de la salinidad.

Palabras claves: Patata, Metil Jasmonato, Salinidad, Estrés salino, Prolina, Actividad antioxidante, Catalasa, Peroxidasa.

RESUM

La salinitat és un dels principals factors que cada vegada més limiten la producció agrícola mundial i especialment a les zones àrides i semiàrides del planeta. L'estrès salí afecta directament a diversos processos fisiològics de les plantes, provocant la disminució del seu creixement, desenvolupament i producció.

Al llarg de l'evolució, les plantes han aconseguit desenvolupar diferents tipus d'estratègies per fer front a l'estrès salí. L'acumulació d'alguns compostos osmoprotectors als teixits, com la prolina, permetin a la planta fer front aquest tipus d'estrès. La prolina protegeix i restaura els processos fisiològics i bioquímics afectats per altes concentracions de sodi i clor en el citosol. Aquest aminoàcid osmoprotector s'ha descrit com un marcador potencial per determinar la tolerància a la salinitat i sequera en diverses espècies. D'altra banda, una altra resposta a l'estrès biòtic i abiòtic també involucra l'activitat antioxidant d'alguns enzims, com es el cas, de la catalasa i la peroxidasa, enzims eficaços per evitar l'acumulació de radicals lliures als teixits vegetals. De la mateixa manera, algunes hormones vegetals, com l'àcid salicílic, l'àcid jasmònic, l'etilè, els brasinosteroides i l'àcid abscísic estan relacionats directament amb l'activació de les respostes de defensa de les plantes. L'aplicació exògena d'aquestes hormones vegetals permetin activar i/o elicitar el sistema de defensa de les plantes per mitigar els danys produïts per la salinitat. En particular, el metil jasmonat (MeJa) presenta un efecte estimulants del desenvolupament vegetal i protector davant l'estrès salí.

El cultiu de la patata es el quart cultiu en importància alimentària a nivell mundial, darrere del blat de moro, el blat i l'arròs. En els últims anys la producció d'aquest tubercle es manté estable als països desenvolupats, mentre que als països en vies de desenvolupament, on el seu cultiu era difícil, la producció del tubercle s'ha incrementat ràpidament pel seu interès alimentari. Per altra banda, el cultiu de la patata, tan en països desenvolupats com en desenvolupament, es afectat per diversos factors, entre ells, estressos abiòtics, com la sequera i la salinitat, els quals provoquen una disminució important en la producció de tubercles.

Tenint en compte la importància mundial del cultiu de la patata i els factors abiòtics que provoquen una disminució de la seva producció, es necessari la recerca i desenvolupament de tècniques o metodologies pràctiques que permetin seleccionar i caracteritzar cultivars amb potencial productiu i tolerants en condicions d'estrès abiòtics com la salinitat.

En aquest estudi es va caracteritzar *in vitro* quatre cultivars de patates amb diferents cicles de maduració, Agata, Monalisa, Kennebec i Red Pontiac, la caracterització es va realitzar en base al desenvolupament vegetatiu i radical dels explants. Per determinar l'efecte vegetatiu i radical dels explants amb l'aplicació exògena de cinc concentracions de MeJa (0, 10, 50, 250 i 1250 nM). Així mateix, es va determinar la tolerància dels cultivars de patata a l'estrès salí, explants dels quatre cultivars van ser exposats a concentracions creixents de salinitat (0, 30, 60, 90 i 120 mM), dels quals es va avaluar el seu desenvolupament vegetatiu i radical. Una vegada determinada la tolerància a la salinitat i l'efecte de l'aplicació exògena del MeJa, es va estudiar l'efecte protector del MeJa respecte l'estrès salí, combinant les concentracions de NaCl i MeJa en els quatre cultivars de patata avaluats. La determinació de l'aminoàcid prolina i l'activitat enzimàtica de la catalasa i de la peroxidasa es van emprar com indicadors del grau de tolerància a l'estrès salí.

Els resultats obtinguts mostren clarament l'efecte negatiu de la salinitat sobre el desenvolupament de tots els cultivars avaluats. La salinitat va afectar en major grau als cultivars més primerencs, com Agata, i en menor grau als cultivars més tardans, com Kennebec i Red Pontiac. L'aplicació exògena de MeJa, en alguns cultivars, va permetre incrementar el desenvolupament radical i reduir l'impacte negatiu de la salinitat sobre el desenvolupament dels explants de patata. De manera general, les concentracions entre 50 i 1250nM de MeJa van reduir els efectes negatius de la salinitat en els cultivars exposats a tots els nivells de salinitat assajats. El contingut de l'aminoàcid prolina en els explants augmentaren proporcionalment amb les concentracions de NaCl i van ser més elevats en els cultivars menys tolerants respecte als cultivars amb major tolerància sota condicions d'estrès salí. L'activitat enzimàtica de la catalasa, en el cultivar Kennebec, va augmentar amb les concentracions salines, mentre que l'aplicació exògena de les concentracions de MeJa també incrementaren l'activitat d'aquest enzim en totes les concentracions de NaCl assajades.

De forma semblant, l'activitat de la peroxidasa, en el cultivar Kennebec, també va augmentar amb les concentracions salines assajades i l'addició de MeJa al medi de cultiu no va tindre cap efecte sobre l'activitat de l'enzim fins que els explants van estar exposats a un estrès salí de 90 i 120mM on l'addició de MeJa va reduir l'activitat de la peroxidasa.

Aquests resultats suggereixen que la tècnica de cultiu *in vitro* permet caracteritzar cultivars de patata tolerants a l'estrès salí, així com també avaluar l'eficàcia de compostos que aplicats de forma exògena permetin obtenir un major desenvolupament vegetatiu i radical, i mitigar els efectes negatius de la salinitat.

Paraules claus: Patata, Metil Jasmonat, Salinitat, Prolina, Estrès Salí, Activitat antioxidant, Catalasa, Peroxidasa.

SUMMARY

Salinity is one of the main factors that limits crop productivity, especially in arid and semi-arid areas of the world. The deleterious effects of salinity on plant growth are associated with the vegetative and root growth. Along evolution, plants have developed different strategies to counteract salinity. The accumulation of osmoprotectant compounds in plant tissues, such as proline, allows to reduce the salinity stress. Proline protects and restores the physiological and the biochemical processes affected by high NaCl concentrations in the cytosol. Proline has been described as a potential marker for salinity and drought tolerance in several species. Alternatively, another response to biotic and abiotic stress also involves the antioxidant activity of enzymes such as catalase and peroxidase. These enzymes are effective in preventing free radical accumulation in plant tissues. Also, some plant hormones, such as salicylic acid, jasmonic acid, ethylene, abscisic acid and brassinosteroides, are directly related to the activation of the plant defense system. The exogenous supply of these plant hormones activates the plant defense system responses to mitigate the deleterious salinity effects. In particular methyl jasmonate (MeJa) has a stimulating effect on plant growth and also protects against salt stress.

The potato crop ranks as the fourth important crop in the world, after corn, wheat and rice. In recent years, the production of potatoes has remained stable in developed countries while in developing ones, where its nutritional interest is high and its cultivation has been considered difficult, tuber production has increased rapidly. Moreover, in both, developed and developing countries the potato crop is affected by several factors, including abiotic stresses, such as drought and salinity, which cause important decreases in tuber yield. Considering the global relevance of the potato crop and the abiotic factors that reduce its production, it is necessary to find and develop techniques, practices and methodologies to select and characterize productive and tolerant potato cultivars with high potential to respond under abiotic stress such as salinity.

In this study we have characterized *in vitro* four potato cultivars with different maturation cycle, Agata, Monalisa, Kennebec and Red Pontiac. The characterization has been carried out based on the vegetative and root development of the explants.

The effect of exogenous MeJa, 0, 10, 50, 250, 1250nM, was evaluated according to vegetative and root development of the explants. Also salinity tolerance of the potato cultivars, explants *in vitro* cultivated with 0, 30, 60, 90 and 120mM NaCl was evaluated determining vegetative and root development. After the salinity tolerance and the effect of the exogenous MeJa application was achieved, the preventive effect of MeJa against salinity was evaluated by combining the NaCl and MeJa concentrations in all potato cultivars tested. Proline determination and enzymatic activity of catalase and peroxidase were used as indicators for salt stress tolerance.

Our results clearly show the deleterious effects of salinity on vegetative and root development in all potato cultivars evaluated. The effect of salinity affected mostly to the earliest cultivars, Agata, and less to the later cultivars, Kennebec and Red Pontiac. Exogenous MeJa applications in some cultivars led to increased root development and reduced the deleterious effects of salinity on the development of the potato explants. Overall, concentrations of 50 to 1250nM of MeJa reduced the negative effects of salinity in all cultivars. The level of the amino acid proline in the explants increased according to the NaCl concentration; proline levels were higher in the less salinity tolerant, Agata, respect to the other more tolerant cultivars under salinity conditions. Catalase activity, in Kennebec cultivar, did not increased with the salt concentration, whereas the exogenous MeJa application increased catalase activity. On the other hand, peroxidase activity, in Kennebec cultivar, increased with the salt concentration, and the incorporation of MeJa to the culture medium had no effect on peroxidase activity even when texplants were exposed to 90mM NaCl. With the maximum salt concentration, 120mM, MeJa significantly reduced peroxidase activity.

These results suggest that *in vitro* culture is effective to characterize potato cultivars for salinity tolerance and to evaluate the efficiency of compounds that exogenously applied could enhance vegetative and root development and mitigate the deleterious effects of salinity.

Keywords: Potato, Methyl Jasmonate, Salinity, Salt stress, Proline, Antioxidant activity, Catalase, Peroxidase.

Índice de contenidos

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1. CULTIVO DE PATATA	3
1.1.1. Origen y taxonomía de la planta de patata	3
1.1.2. Importancia socioeconómica del cultivo de la patata	5
1.1.3. Cultivares de patata en España	6
1.1.4. Cultivo de patata	7
1.1.5. Requerimientos del cultivo	10
1.1.6. El cultivo in vitro en la mejora de la planta de patata	12
1.2. ESTRÉS EN PLANTAS	13
1.2.1. Concepto de estrés	13
1.2.2. Tipos de estrés	13
1.2.3. Importancia del estudio del estrés abiótico en plantas	14
1.3. ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS	14
1.3.1. Estrés salino	15
1.3.2. Efectos de la salinidad en las plantas	16
1.3.3. Tolerancia a la salinidad	19
1.3.4. Respuesta de las plantas al estrés salino	20
1.3.5. Importancia de la prolina frente al estrés salino	23
1.3.6. Importancia de las enzimas antioxidantes frente al estrés salino	25
1.4. REGULACIÓN HORMONAL DE LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS	28
1.4.1. Jasmonatos	30
1.4.2. Efectos de los jasmonatos en las plantas	32
1.5. REFERENCIAS	35
2. OBJETIVOS	47
3.- CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN	51
3.1. INTRODUCCIÓN	51
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.3. RESULTADOS	57
3.4.-DISCUSIÓN	60
3.5. CONCLUSIONES	63
3.6. REFERENCIAS	64
4. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DEL METIL JASMONATO SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN	69
4.1. INTRODUCCIÓN	69
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	71
4.3. RESULTADOS	72
4.4. DISCUSIÓN	80
4.5. CONCLUSIONES	82
4.6. REFERENCIAS	83
5. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN	89
5.1. INTRODUCCIÓN	89
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	93

5.3. RESULTADOS	94
5.4. DISCUSIÓN	101
5.5. CONCLUSIONES	104
5.6. REFERENCIAS	105
6. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL POSIBLE EFECTO PROTECTOR DEL METIL JASMONATO AL ESTRÉS SALINO SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN	113
6.1. INTRODUCCIÓN	113
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	116
6.3. RESULTADOS	117
6.4.-DISCUSIÓN	131
6.5. CONCLUSIONES	140
6.6. REFERENCIAS	141
6.7. ANEJOS	147
7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROLINA EN EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN EXPUESTOS AL ESTRÉS SALINO Y METIL JASMONATO.....	153
7.1. INTRODUCCIÓN	153
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	156
7.3. RESULTADOS	158
7.4. DISCUSIÓN	163
7.5. CONCLUSIONES	168
7.6. REFERENCIAS	169
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA Y PEROXIDASA EN EXPLANTOS DE PATATA DEL CULTIVAR KENNEBEC EXPUESTOS AL ESTRÉS SALINO Y A CONCENTRACIONES DE METIL JASMONATO.....	175
8.1. INTRODUCCIÓN	175
8.2. MATERIALES Y MÉTODOS	179
8.3. RESULTADOS	181
8.4. DISCUSIÓN	183
8.5. CONCLUSIONES	187
8.6. REFERENCIAS	188
9. DISCUSIÓN GENERAL	193
9.1. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVARES DE PATATA	193
9.2. EFECTO DEL METIL JASMONATO SOBRE EL DESARROLLO DE LOS EXPLANTOS DE PATATA	195
9.3. EFECTO DEL ESTRÉS SALINO EN CULTIVARES DE PATATA.....	198
9.4. EFECTO PROTECTOR DEL METIL JASMONATO FRENTE AL ESTRÉS SALINO EN CULTIVARES DE PATATA.....	201
9.5. DETERMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE PROLINA COMO INDICADOR DE TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO.....	203
9.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRENTE AL ESTRÉS SALINO	205
9.7. REFERENCIAS	208
10. CONCLUSIONES GENERALES	219

Índice de tablas

PÁGINA

Tabla 1. Tolerancia a la salinidad de los principales cultivos hortícolas.....	18
Tabla 2. Metabolitos de los vegetales relacionados con el estrés salino en plantas.	23
Tabla 3. Principales características de los tubérculos de los cultivares de patata evaluados.	54
Tabla 4. Características de desarrollo vegetativo y radical de los explantos de cada cultivar de patata después de 4 semanas de cultivo.....	57
Tabla 5. Porcentaje de suelos cultivables afectados por la salinidad en el mundo, en millones de hectáreas cultivables.	89

Índice de figuras

	PÁGINA
Figura 1. Señales que causan estrés abiótico en plantas.....	15
Figura 2. Clasificación de los grados de tolerancia a la salinidad de los cultivos.....	17
Figura 3. Esquema de la respuesta de las plantas al estrés salino.	20
Figura 4. Estructura del ácido jasmónico to y del metil jasmonato	31
Figura 5. Señalización de las respuestas del ácido jasmónico y de los jasmonatos en general en el desarrollo de las plantas y ante situaciones de estrés biótico y abiótico...	34
Figura 6. Aspecto de los tubérculos de los cultivares de patatas cultivadas en España y objeto de estudio de este trabajo.....	54
Figura 7. Desarrollo vegetativo y radical de los cuatro cultivares de patata después de cuatro semanas de cultivo <i>in vitro</i>	58
Figura 8. Porcentaje de partición de asimilados hacia la parte aérea y radical en base al peso seco de los explantos.	59
Figura 9. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud de explanto en los cuatro cultivares de patata, a las cuatro semanas de cultivo.. ..	72
Figura 10. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el área foliar del explanto en los cuatro cultivares de patata.....	73
Figura 11. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud del sistema radical del explanto en los cuatro cultivares de patata.	74
Figura 12. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la cantidad de raíces (0= ninguna; 1= 1 a 3 raíces; 2=4 a 6 raíces; 3= 7 a 10 raíces) del explanto en los cuatro cultivares de patata.	75
Figura 13. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco del explanto en los cuatro cultivares de patata.	76
Figura 14. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el porcentaje de peso seco de los explantos respecto al control para cada uno de los cultivares de patata.	77
Figura 15. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el porcentaje de partición de asimilados, en base al peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata.	78
Figura 16. Desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata después de cuatro semanas de cultivo expuestos a 5 concentraciones de MeJa en el medio de cultivo	79
Figura 17. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre la longitud de los explantos de los cuatro cultivares de patata.....	94
Figura 18. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre el área foliar de los explantos de los cuatro cultivares de patata.	95
Figura 19. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre la longitud del sistema radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata.....	96
Figura 20. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre la cantidad de raíces de los explantos de los cuatro cultivares de patata.	97
Figura 21. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre el peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata.	98
Figura 22. Porcentaje de variación del peso seco debido a las concentraciones de NaCl respecto al control para cada uno de los cultivares de patata.	99

Figura 23. Desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a 5 concentraciones de NaCl en el medio de cultivo después de cuatro semanas de cultivo.....	100
Figura 24. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad.	117
Figura 25. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso fresco de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad.....	119
Figura 26. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el área foliar de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad..	121
Figura 27. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de las hojas de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad..	123
Figura 28. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud del sistema radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad.	124
Figura 29. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la cantidad de raíces de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad.	125
Figura 30. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de raíces (mg) de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad.	127
Figura 31. Variación del porcentaje del peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados con 4 concentraciones de MeJa y expuestos a concentraciones de NaCl respecto tratamiento sin MeJa.	129
Figura 32. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad..	147
Figura 33. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de los tallos de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad.	149
Figura 34. Estructura química de la prolina.	153
Figura 35. Contenido de prolina detectado en los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a concentraciones de NaCl.....	158
Figura 36. Contenido de prolina detectado en los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a concentraciones de MeJa.....	159
Figura 37. Contenido de prolina detectado en los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a concentraciones de MeJa y NaCl.	160
Figura 38. Actividad de la catalasa (CAT) en explantos del cultivar de patata Kennebec expuestos a concentraciones de 0, 30, 60, 90 y 120mM de NaCl y 0, 10, 50 , 250 y 1250nM de MeJa.	181
Figura 39. Actividad de la peroxidasa (POD) en explantos del cultivar de patata Kennebec expuestos a concentraciones de 0, 30, 60, 90 y 120mM de NaCl y 0, 10, 50 , 250 y 1250nM de MeJa.	182

Abreviaturas y símbolos utilizados

ABA: Ácido abscísico
ADN: Ácido desoxi ribonucleico
ANOVA: Análisis de variancia
CAT: Catalasa
CIP: Centro Internacional de la Papa
Cl: Cloro
CO₂: Dióxido de carbono
dS/m: Desi siemens por metro
EC: Conductividad eléctrica
ET: Etileno
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
JA: Ácido jasmónico
LOX: lipoxigenasa
MAGRAMA: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación
MAPK's: Proteínas quinasa
MeJa: Metil Jasmonato
Na: Sodio
NaCl: Cloruro de sodio
nM: nano molar
mM: milimolar
PIs: Inhibidores de proteínasa
POD: Peroxidasa
PRO: Prolina
ROS: Especies reactivas al oxígeno
SA: Ácido salicílico
SAR: Resistencia sistémica adquirida
SIR: Resistencia sistémica inducida
SOD: Súper óxido dismutasa
UE: Unión Europea
UV: Ultra violeta

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. CULTIVO DE PATATA

1.1.1. Origen y taxonomía de la planta de patata

Procedente de América del Sur, la patata parece tener dos centros de origen: el altiplano andino en los alrededores del lago Titicaca, al Sur de Perú y el Oeste de Bolivia para (*Solanum. tuberosum* ssp. *andigena*), y el Centro Sur de Chile para (*Solanum. tuberosum* ssp. *tuberosum*). Su domesticación se sitúa en el Sur de Perú hace unos 10.000 años (CIP, 2014). En Europa fue introducida por los españoles, desde Perú, a través de las Islas Canarias a mediados del siglo XVI (la primera referencia del cultivo de la patata fuera de su zona de origen data de 1567, en Canarias), desde donde pasa rápidamente a la península ibérica; Galicia fue probablemente la primera región en cultivarla, en el mismo siglo XVI (Martínez, 1996; Ovchinnikova et al., 2011).

Desde España la patata se distribuyó muy lentamente por Europa y por el resto del mundo. En los Países Bajos se comenzó a cultivar con sentido económico hacia 1620, aunque al principio se consideraba una planta ornamental y se utilizó principalmente para alimento del ganado. Sin embargo, fue a finales del siglo XVIII cuando la patata adquiere importancia como cultivo básico para la alimentación humana, como sustituto a los cereales en caso de escasez. A partir de entonces se extendió y adquirió singular importancia en la economía agraria mundial (Hawkes, 1992; Ovchinnikova et al., 2011).

La patata pertenece a la familia de las solanáceas, y al género *Solanum*, que además de la patata reúne otras especies también de gran importancia agrícola, como el tomate o la berenjena; su nombre científico es *Solanum tuberosum*. La especie *Solanum tuberosum* se divide en dos subespecies: la *andigena*, adaptada a tuberizar bajo condiciones de día corto y cultivada principalmente en los Andes, y la *tuberosum*, subespecie que hoy se cultiva ampliamente en todo el mundo, adaptada a tuberizar bajo fotoperiodo de días más largos (Hawkes, 1992).

La patata es una planta herbácea, dicotiledónea, anual, que se comporta como una especie perenne caducifolia, ya que puede reproducirse por sus tubérculos. Sus hojas son compuestas, imparipinnadas, con 3 o 4 pares de folíolos ovales y culminados por un solo folíolo de mayor tamaño. Estas hojas presentan pelos o tricomas en su superficie, en grado variable dependiendo del cultivar. La planta de patata posee tres tipos de tallos que se describen a continuación:

Aéreos: Son tallos que se originan a partir de las yemas presentes en el tubérculo usado como lo que se ha denominado “semilla”. Son tallos gruesos, fuertes y angulosos, erguidos al principio y que con el tiempo se van inclinando progresivamente hacia el suelo. Alcanzan una altura variable entre 0.5 y 1 metros. El número de tallos por planta es un factor determinante del rendimiento de la cosecha; a mayor número de tallos mayor cantidad de tubérculos.

Estolones: son tallos subterráneos que tienen un crecimiento horizontal bajo el suelo, formados por brotes laterales que salen de la base de los tallos aéreos. En cada estolón se forman los tubérculos.

Tubérculos: Son parte de los tallos subterráneos (estolones) modificados mediante la acumulación de reservas, principalmente almidón, y que constituyen un órgano de reproducción vegetativa. Sobre su superficie existen unos hundimientos, más o menos acusados, conocidos vulgarmente como “ojos”, donde se resguardan las yemas vegetativas que al brotar darán lugar a los nuevos tallos. Los ojos se disponen siguiendo una filotaxia espiralada sobre la superficie del tubérculo.

Los tubérculos son los órganos comestibles de la planta de patata, y se desprenden del resto de la planta al llegar al estado de madurez o al realizar el arranque en la cosecha. Pueden presentar una forma alargada, redondeada u oblonga y su color puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo.

Las raíces son fibrosas, finas, muy ramificadas y extendidas superficialmente. Tienen un débil poder de penetración, pudiendo penetrar hasta 0.8 m de profundidad y sólo adquieren un buen desarrollo en un suelo mullido.

Las flores se agrupan en inflorescencias cimosas, situadas en el extremo de los tallos. Tienen cinco pétalos unidos por sus bordes, que conforman una corola con forma de estrella. Su color varía del blanco al lila o morado según los cultivares. Es una planta autógama y la floración de esta especie tiene relevancia en programas de mejora genética.

Los frutos consisten en pequeñas bayas redondeadas de color verdoso de 1 a 3 cm de diámetro, que se tornan amarillas al madurar y contienen una gran cantidad de semillas verdaderas.

1.1.2. Importancia socioeconómica del cultivo de la patata

La patata constituye un alimento fundamental en la dieta humana, y tiene además otros usos como planta forrajera e industrial suministradora de alimento para el ganado y de materia prima para la industria del almidón y del alcohol (CIP, 2014).

La patata es el cuarto cultivo mundial en importancia para la alimentación humana, detrás del maíz, el trigo y el arroz (CIP, 2014). La producción mundial superó en 2011 los 374 millones de toneladas, ocupando una superficie de 19 millones de hectáreas. Los principales productores del tubérculo son actualmente China e India (por este orden) que acaparan más de la tercera parte de la producción mundial (FAO, 2011).

La producción en España se encuentra estabilizada desde 2005 en torno a las 2.500.000 toneladas, con casi 85.000 hectáreas de cultivo, ocupando el octavo puesto en producción entre los países de la UE (FAO, 2011). Según León (2010), el rendimiento promedio del cultivo en España está en unas 30 t/ha, (algo menos de 20 t/ha en secano y casi 33 t/ha en regadío), lejos de países como Holanda, Bélgica, Alemania, Francia o Gran Bretaña que superan las 40 t/ha de producción media. La producción española está también muy por debajo de la demanda del mercado, por lo cual se importan anualmente unas 700.000 toneladas, de las que más del 70 % procede de Francia (León, 2010).

Por comunidades, según datos del MAGRAMA (2012), la comunidad de Castilla-León es la principal productora de patata (841.065 toneladas y 19.888 hectáreas cultivadas), seguida por Galicia (473.498 toneladas y 19.667 hectáreas cultivadas) y Andalucía (311.863 toneladas y 11.754 hectáreas cultivadas).

1.1.3. Cultivares de patata en España

Actualmente España produce “semilla” de patata de alta calidad, sin embargo, la demanda de “semilla” es mayor a la oferta y se importa semilla de los países productores de Europa occidental. Los cultivares comerciales de patata presentan diferentes tiempos de maduración o recolección, los cuales dependen directamente, además del genotipo, de las condiciones climáticas (radiación, temperatura y precipitación) y edáficas del sitio de cultivo. Es decir que un cultivar que en condiciones de alta radiación y temperatura presenta un ciclo de maduración temprano, sembrado en otro lugar con menor radiación y temperatura tendrá un ciclo más prolongado de maduración y recolección. León (2010) indica que los principales cultivares de patata de siembra que se producen en España son Jaerla y Baraka, seguidas a cierta distancia por Spunta, Désirée y Red Pontiac. En España los cultivares de patata se han clasificado en los siguientes grupos de acuerdo a la duración del ciclo de maduración:

Precozes o extra tempranos: Su ciclo es inferior a 90 días. En este grupo se pueden incluir los cultivares: Jaerla, Ostara, Duquesa, Ática y Palogán, entre las de carne amarilla y Royal Kidney, Olinda y Romano, entre las de carne blanca. Su cultivo es típico de Canarias y Andalucía oriental. Se siembran en octubre - noviembre y se recogen desde mediados de enero a mediados de abril. Otros cultivares frecuentes son Spunta y Agata (Pastor, 1983; Appacale, 2008).

Semi tempranos: Con ciclo entre 90 y 120 días. Se pueden incluir en este grupo a los cultivares: Arran Banner, Agria, Claustar, Desirée, Edzina, Monalisa, Ayala, Cosmos, Rosalie, Spunta, Afrodita, Arnova y Báltica. Se producen sobre todo en la costa mediterránea (Valencia, Murcia y Cataluña) aunque también se producen, en menor cantidad en algunas regiones de Asturias y Galicia. Se suelen sembrar en diciembre - febrero y se recogen desde mediados de abril a mediados de junio (Pastor, 1983; Appacale, 2008).

De media estación o semi tardíos: Tienen un ciclo de 120 a 150 días. Son producciones típicas de las zonas del interior y del norte de España que se siembran en febrero - marzo y se recogen desde mediados de junio hasta mediados de septiembre. Los principales cultivares de este tipo son Kennebec y Désirée (Pastor, 1983; Appacale, 2008).

Tardíos: Con ciclo superior a los 150 días. En este grupo están los cultivares: Álava, Alfa, Goya, Sergen, Fontane, Ketrel, Victoria y Baraka, de carne amarilla y Kondor, Víctor y Turia, de carne blanca. Se siembran entre julio y agosto y se recogen a mediados de enero y febrero. Se distingue, a veces, entre tardías, que se recogen hasta octubre - noviembre, y muy tardías, típicas de Andalucía interior que se recogen de noviembre a enero. A veces en zonas más templadas, los cultivares cultivados son los mismos, la diferencia fundamental consiste en que su ciclo se prolonga aproximadamente un mes más que los anteriores (Pastor, 1983; Appacale, 2008).

La clasificación de los cultivares se puede realizar también según otros caracteres como: el color y la textura de la piel, el color de la carne, el número de “ojos”, la forma del tubérculo, las características de los brotes y de la parte aérea, la productividad, la precocidad de la brotación, la tuberización y la resistencia a plagas y enfermedades, etc. Por último, otro criterio a considerar en la elección del cultivar es su uso, ya sea para la industria o para consumo en fresco de los tubérculos cosechados.

1.1.4. Cultivo de patata

En el desarrollo del cultivo de la patata se distinguen tres etapas (Pumisacho y Sherwood, 2002; Roman Cortez y Hurtado, 2002): la brotación y emergencia, la tuberización y la maduración de los tubérculos.

Brotación y emergencia

El tubérculo presenta el fenómeno de latencia o dormancia. Los tubérculos, mientras se forman y aún después de la muerte de la planta, tienen una alta concentración de inhibidores del crecimiento que impiden que las yemas broten (Pumisacho y Sherwood, 2002). Este período de dormancia tiene una duración variable (7 - 12 semanas

aproximadamente) y depende fundamentalmente del cultivar y de las condiciones de temperatura, humedad, ventilación y luz a las que se almacena los tubérculos.

La relación entre inhibidores y promotores del crecimiento va variando gradualmente a lo largo de tiempo de almacén. El tubérculo pasa del estado de dormancia a un estado que llamamos de brotación apical, en el cual la yema apical del tubérculo comienza a brotar mientras que las otras aún están inhibidas. Si se siembran los tubérculos en este estado, la yema apical crecerá y se desarrollará rápidamente, produciéndose por cada tubérculo “semilla” un solo tallo que luego se ramificará. Si en lugar de plantarse se mantienen almacenados bajo condiciones de humedad, luz, ventilación y temperatura adecuadas, la dominancia apical se va perdiendo gradualmente y las yemas secundarias empiezan también a brotar pasando el tubérculo a un estado que llamamos de brotación múltiple. Al ser sembrados en este estado, cada uno de los tubérculos dará origen a varios tallos que emergerán casi simultáneamente. De este modo, para una misma cantidad de tubérculos sembrados, la densidad de tallos que se logran puede ser 2-3 veces mayor que sembrando tubérculos en brotación apical.

Una vez la planta de patata ha emergido, entra en la fase de desarrollo vegetativo, donde se observa el mayor crecimiento de hojas, tallos, raíces y también estolones hasta dar inicio a la tuberización. La tuberización conlleva a una disminución paulatina del desarrollo vegetativo hasta que la planta se va secando e incluso puede llegar a morir.

En las primeras etapas del desarrollo la planta crece a expensas de las reservas acumuladas en el tubérculo madre. La gran cantidad de reservas que este contiene permiten que, en condiciones óptimas de humedad y temperatura, la expansión del área foliar sea muy rápida. Al ir aumentando el área foliar fotosintéticamente activa, ésta produce una importante cantidad de asimilados.

Desde el punto de vista agronómico interesa, en lo posible, acortar la duración de la etapa de brotación y emergencia con la finalidad de aprovechar al máximo las condiciones climáticas favorables para el cultivo y que nos permitan reducir el número de días hasta la recolección, garantizando siempre un suficiente desarrollo vegetativo. El cultivo de patata en condiciones óptimas de crecimiento puede llegar a cubrir totalmente el suelo (surcos) en 40 - 45 días después de la emergencia.

Tuberización

El inicio de la tuberización viene determinado principalmente por factores ambientales, fundamentalmente la temperatura y la duración del día, o bien, puede verse modificado por las prácticas culturales; una mayor densidad de plantación, el abastecimiento oportuno de agua y el suministro adecuado de nutrientes, favorecerán un mayor desarrollo de la planta. Aportes excesivos de nitrógeno pueden prolongar el desarrollo vegetativo, retrasando la formación de tubérculos (Pumisacho y Sherwood, 2002; Roman Cortez y Hurtado, 2002).

Cuando los tallos aéreos de la planta tienen un desarrollo suficiente, la yema apical se diferencia en floral y la dominancia apical cesa, las yemas subterráneas de los tallos dan origen a los estolones que crecen en longitud a partir de la tercera y cuarta semana después de la emergencia de la planta hasta que reciben estímulos para iniciar la tuberización. En la tuberización se ensancha el extremo del estolón dando origen a los tubérculos, y los asimilados disponibles se comparten entre el crecimiento del área foliar y el de los estolones y tubérculos. A medida que la formación de tubérculos aumenta la producción de asimilados se destina a estos en detrimento del crecimiento del follaje. A continuación se detiene la ramificación y la aparición de hojas nuevas; la duración de esta etapa varía entre 70 y 150 días dependiendo del cultivar.

Maduración de los tubérculos

A partir de que el follaje y si es el caso la floración alcanzan su máximo desarrollo, y no hay más desarrollo de hojas nuevas, se promueve la fase de máximo crecimiento de los tubérculos y todos los asimilados disponibles se destinan a su crecimiento.

Las hojas más viejas van muriendo y el área foliar en su conjunto va gradualmente bajando su eficiencia fotosintética hasta que no es suficiente para mantener el crecimiento de los tubérculos. La planta toma un color amarillento y eventualmente muere, en este punto los tubérculos alcanzan su máximo contenido de materia seca y tienen la epidermis bien formada.

1.1.5. Requerimientos del cultivo

Temperatura

La planta de patata es de clima templado - frío. La temperatura óptima para el cultivo está entre los 13 y los 18°C. A temperaturas superiores, entre 20-25°C, se produce un mayor desarrollo vegetativo que va en detrimento de la producción de tubérculos. Por el contrario, a temperaturas por debajo de 6-8°C el crecimiento se detiene (cero vegetativo), sin embargo los brotes pueden crecer por encima de los 2°C. A una temperatura de 0°C, la parte aérea se congela y al aumentar la temperatura puede rebrotar. Si la temperatura está por debajo de -2°C la planta muere, los tubérculos se congelan y no existe posibilidad de rebrote. Al efectuar la plantación es necesario que la temperatura del suelo sea superior a 7°C, siendo la óptima para la formación de tubérculos entre 15 a 20°C, a partir de ese límite su ritmo de crecimiento disminuye y se detiene a partir de los 30°C. Temperaturas, superiores a 23°C, retrasan el inicio del crecimiento y volumen de los tubérculos debido al decremento de la partición de asimilados hacia los tubérculos (Van Dam, et al., 1996).

Humedad

La humedad relativa de la atmosfera es un factor muy importante para el éxito del cultivo (Van Dam, et al., 1996). La humedad excesiva, especialmente si va acompañada de temperaturas en torno a 18-20°C, favorece el desarrollo de enfermedades, sobre todo para la causada por *Phytophthora infestans*, el mildiu. El periodo crítico para esta enfermedad es el que va desde la aparición de las flores hasta a la maduración del tubérculo. Por otra parte, humedades relativas bajas favorecen una mayor transpiración y pérdida de agua, lo cual puede afectar a la formación de los tubérculos (Alva et al., 2012).

Fotoperiodo

El número diario de horas de luz (fotoperiodo) tiene gran importancia en el desarrollo de la planta de patata, especialmente en la tuberización que en condiciones de días largos involucra cambios bioquímicos y moleculares que están relacionados directamente con la percepción de la luz (Rodríguez-Falcon, et al., 2006; Sarkar, 2010). En los cultivares de la subespecie *andigena*, los fotoperiodos cortos (8 a 12 horas) favorecen la formación de tubérculos, mientras los fotoperiodos largos inducen el crecimiento vegetativo y floración; de igual manera, en los cultivares de la subespecie *tuberosum*, los fotoperiodos neutros (12 a 14 horas) favorecen la tuberización y los días largos inducen crecimiento vegetativo y floración (Sarkar, 2010). No obstante, cada cultivar posee el denominado fotoperiodo crítico que es el límite de horas de luz por el cual se inhibe la tuberización.

Suelo

La patata es una planta poco exigente a las condiciones edáficas, prefiriendo en general suelos sueltos, profundos, ricos en materia orgánica y con un pH ligeramente ácido, comprendido entre 5,5 y 6. Los menos favorables son los terrenos fuertes, compactados y pedregosos, ya que los órganos subterráneos encuentran dificultades mecánicas para su desarrollo homogéneo. Los cultivares tardíos se adaptan mejor a este tipo de suelos de textura media o fuerte (Román Cortez y Hurtado, 2002). La patata está considerada como una planta ligeramente tolerante a la salinidad (Katerji et al., 2000).

Riego

En cuanto a la humedad del suelo, el cultivo de la patata no soporta el estrés hídrico y tampoco soporta la alternancia de periodos con estrés hídrico con otros de humedad excesiva (Harris, 1978). La falta de agua provoca la reducción de la tasa fotosintética de la planta y reduce directamente el contenido y translocación de los carbohidratos hacia los tubérculos. Haverkort (1986) señala que para obtener altas producciones de patata la necesidad hídrica del cultivo está entre 600 y 800 milímetros de agua durante el ciclo de cultivo; obviamente, esta demanda depende de las condiciones ambientales y de la duración del ciclo vegetativo de cada cultivar. El manejo del riego se realiza mediante el

cálculo semanal de la evapotranspiración, manteniendo un porcentaje de humedad del suelo que no debe ser inferior al 40% de la capacidad de campo durante el cultivo (Alva et al., 2012). De forma general, el déficit hídrico afecta a todas las fases del cultivo, pero tiene mayor impacto negativo durante el inicio de la tuberización e inmediatamente después (Alva et al., 2012), mientras que el exceso de humedad provoca tubérculos acuosos, poco ricos en fécula y con limitada capacidad de conservación (Green, 1989).

1.1.6. El cultivo *in vitro* en la mejora de la planta de patata

Durante años se ha demostrado en varios estudios que la técnica de cultivo *in vitro* de patata es una herramienta útil que permite la multiplicación rápida de cultivares para la producción de tubérculos de siembra, el saneamiento, la conservación de germoplasma e intercambio de material vegetal (Levitt, 1980; Dodds et al., 1991; Ranalli et al., 1994; Gopal y Minocha, 1998; Donnelly et al., 2003). La utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* permiten mantener controlados los factores ambientales y nutricionales de los explantos, consiguiendo así simular ambientes de cultivo y determinar con ello la respuesta de la planta sometida a condiciones diferentes (Gopal e Iwama, 2007). Por esta razón, el cultivo *in vitro* de secciones nodales constituye una herramienta útil, rápida y que proporciona resultados en un espacio corto de tiempo para la selección de cultivares.

Entre las aplicaciones comerciales del cultivo *in vitro* son conocidas la micropropagación de especies ornamentales, de cultivares de patata para la obtención de microtubérculos, y en banano o plátano entre otros, para obtener plantas libres de virus y enfermedades. Estos materiales pueden obtenerse en cualquier época del año y ocupan un espacio reducido permitiendo mantener una producción continua en el tiempo. Las aplicaciones del cultivo *in vitro* de patata han permitido obtener plantas libres de virus, estudiar la organogénesis, la variación somaclonal y avanzar en su manipulación genética (Gopal e Iwama, 2007).

1.2. ESTRÉS EN PLANTAS

1.2.1. Concepto de estrés

Desde el punto de vista biológico, el estrés es un factor externo capaz de provocar efectos negativos a un organismo. Dentro del marco de la Fisiología Vegetal, el estrés es definido como cualquier factor biótico o abiótico que provoca algún cambio en la fisiología de la planta y que en la mayoría de los casos es potencialmente desfavorable (Levitt, 1980; Nilsen y Orcutt, 1996). El concepto de estrés está íntimamente asociado con la tolerancia al estrés, la cual hace referencia a la aptitud (“fitness”) para hacer frente a un ambiente desfavorable. En la literatura, los términos resistencia y tolerancia son comúnmente utilizados para hacer referencia a un estrés de la planta causado por un factor abiótico, sin embargo, el término tolerancia es el más aceptado en sentido amplio y es el que se hará uso en esta Tesis Doctoral.

Nilsen y Orcutt (1996) señalan que no siempre el estrés provoca un efecto negativo en la planta, a veces una situación de estrés puede presentar un efecto beneficioso. Por ejemplo, la marchitez producida por el déficit hídrico provoca un efecto negativo en la tasa de asimilación del CO₂, pero tiene un efecto positivo porque permite una menor absorción de energía lumínica al cambiar el ángulo de exposición de las hojas y así evitar su daño permanente en las hojas por alta temperatura o radiación.

1.2.2. Tipos de estrés

Teniendo en cuenta los lugares en los que habitan y se cultivan las plantas es fácil comprender que de forma constante están expuestas a situaciones de estrés. En general se han definido dos tipos de estrés, el estrés biótico y el estrés abiótico. El estrés biótico es causado por la acción de otros organismos vivos, como herbívoros, plantas alelopáticas y competidoras y agentes fitopatógenos como hongos, bacterias, virus o nematodos (Hopkins y Hüner, 2008). Mientras que, el estrés abiótico hace referencia a las condiciones medioambientales bajo las que se desarrolla una planta. Este tipo de estrés puede deberse a factores físicos o químicos pero estos generalmente están asociados. Los principales tipos de estreses físico-químicos son el déficit o exceso de agua, temperaturas (alta o bajas, congelación), la concentración de sales en el suelo o en

el agua de riego (componente osmótico) y la radiación ultravioleta. No obstante, factores físicos como metales pesados, salinidad (como ion tóxico) y deficiencia de elementos nutricionales son también causa de un estrés abiótico (Hopkins y Hüner, 2008).

1.2.3. Importancia del estudio del estrés abiótico en plantas

Desde años atrás la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico es un tema que ocupa muchos estudios en Fisiología Vegetal. El entendimiento de cómo las plantas responden ante situaciones de estrés ayuda sin duda a explicar su fisiología y bioquímica, así como también a la búsqueda de soluciones que permitan mitigar los efectos negativos y que repercuten directamente en la producción agrícola. Por otra parte, el estudio de las respuestas a diferentes tipos de estrés facilita a los programas de mejora genética la selección de cultivares tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico (Ali Dib et al., 1990; Hopkins y Hüner, 2008).

1.3. ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS

Las plantas continuamente están expuestas a varios factores que provocan situaciones de estrés, como la salinidad, la sequía, la radiación U.V. El estrés abiótico causa daños importantes a nivel celular, como por ejemplo, un estrés osmótico que involucra la reducción del crecimiento, la multiplicación celular y la deshidratación de los tejidos, afecta directamente al rendimiento de la planta. Los diferentes tipos de estrés abiótico a los que pueden resultar expuestas las plantas se detallan en la Figura 1.

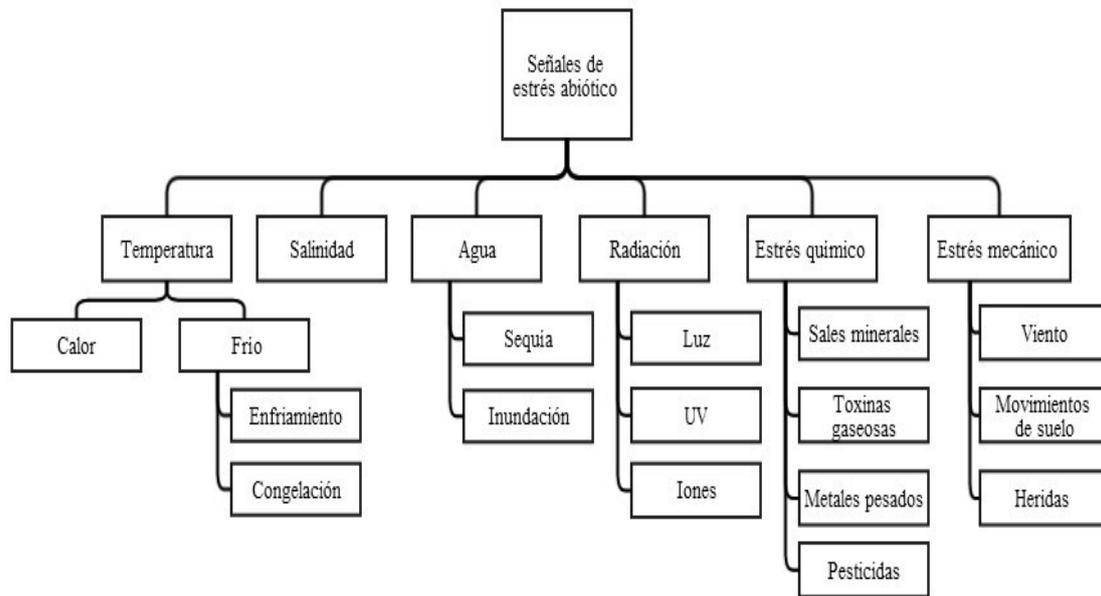


Figura 1. Señales que causan estrés abiótico en plantas.
Fuente: Ramakrishna y Ravishankar, 2011.

El estudio del estrés abiótico es una de las prioridades para la agricultura mundial, el esclarecer los efectos de éste sobre las plantas y cómo las plantas responden ante estas situaciones de estrés es una necesidad actual. Es conocida la importancia de ciertas hormonas y compuestos que están involucrados en la respuesta de tolerancia al estrés abiótico. Entre los compuestos más importantes se encuentra el ácido salicílico, el ácido jasmónico (JA), el metil jasmonato (MeJa), los brasinosteroides, el ácido abscísico y el etileno (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). El aumento de los niveles de estos compuestos en los tejidos de la planta o su aplicación exógena puede activar los mecanismos de respuesta para obtener una mayor tolerancia a situaciones de estrés abiótico (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

1.3.1. Estrés salino

La salinidad es uno de los factores limitantes de la producción agrícola y causa efectos adversos en la germinación, en el vigor y en la producción de los cultivos (Munns y Tester, 2008). La salinización afecta muchas de las áreas con riego principalmente debido al uso de agua salobre. Mundialmente, más de 45 millones de hectáreas se ven afectadas por la salinidad y 1,5 millones de hectáreas dejan de ser productivas cada año como consecuencia de altos niveles de sal en el suelo (Munns y Tester, 2008). Los altos

niveles de salinidad afectan a la planta de diferentes formas: estrés hídrico, toxicidad iónica, desordenes nutricionales, estrés oxidativo, alteración de los procesos metabólicos, desordenes a nivel de las membranas, reducción del crecimiento y desarrollo celular, y genotoxicidad (Hasegawa et al., 2000; Munns, 2002; Zhu, 2007). Todos estos efectos reducen el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas.

1.3.2. Efectos de la salinidad en las plantas

Varios estudios demuestran que niveles de salinidad bajos y moderados, entre 10 y 50mM de NaCl, equivalentes a 1 y 5dS/m respectivamente, afectan muy poco o no afectan en nada al rendimiento de los cultivos (Maggio et al., 2001). Al incrementar las concentraciones de sales, los rendimientos se reducen significativamente en la mayoría de los cultivos. La mayoría de las glicofitas a concentraciones salinas de 100-200mM de NaCl, equivalentes a 10 y 20dS/m, son seriamente afectadas o mueren, la razón es que presentan una baja o ninguna tolerancia a este estrés (FAO, 2014), son plantas sensibles a la salinidad. Una situación diferente se observa en las plantas halófilas que poseen la capacidad de crecer y desarrollarse en las regiones costeras y áridas donde las concentraciones de sales son altas, debido al desarrollo de mecanismos específicos de tolerancia al estrés salino durante su evolución.

Por su parte, la FAO ha establecido parámetros para la clasificación de la tolerancia a la salinidad de los cultivos en base a la producción relativa y medida en base a la conductividad eléctrica (EC). La clasificación de la FAO establece cuatro categorías: sensible, moderadamente sensible, moderadamente tolerante y tolerante (Figura 2).

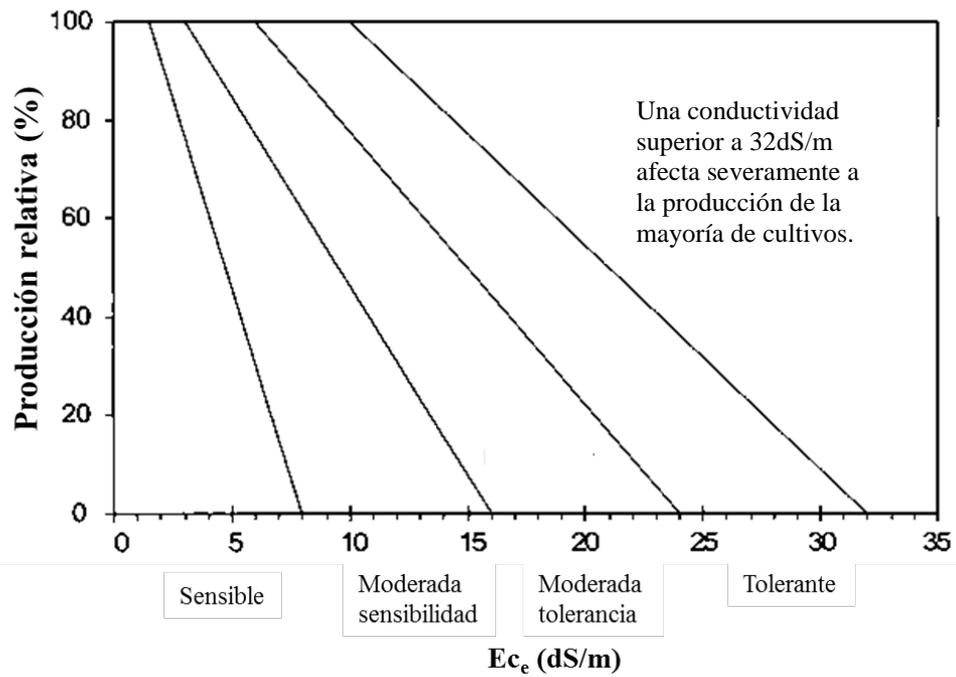


Figura 2. Clasificación de los grados de tolerancia a la salinidad de los cultivos.
Fuente: FAO, 2014.

A continuación se presenta el grado de tolerancia a la salinidad en dS/m para los principales cultivos hortícolas (Tabla 1).

Tabla 1. Tolerancia a la salinidad de los principales cultivos hortícolas.

La tolerancia a la salinidad depende de la capacidad innata de la especie, por este motivo algunas especies pueden mostrar sensibilidad o moderada sensibilidad a un mismo valor de EC.

Tolerancia a la salinidad de algunos cultivos herbáceos				
Nombre común	Nombre botánico	Tolerancia en base a	Parámetros de tolerancia a la salinidad	
			EC (dS/m)	Clasificación
Alcachofa	<i>Cynara scolymus L.</i>	Producción yemas	6,1	Mod. tolerancia
Esparrago	<i>Asparagus officinalis L.</i>	Producción tallos	4,1	Tolerante
Alubias	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Producción semillas	1	Sensible
Remolacha	<i>Beta vulgaris L.</i>	Almacenamiento raíz	4	Mod. tolerancia
Brocoli	<i>Brassica oleracea L.</i>	Producción tallos	2,8	Mod. tolerancia
Repollo	<i>Brassica oleracea L.</i>	Producción repollo	1,8	Mod. tolerancia
Zanahoria	<i>Daucus carota L.</i>	Producción raíces	1	Mod. tolerancia
Perejil	<i>Apium graveolens</i>	Peciolos	1,8	Mod. tolerancia
Maíz dulce	<i>Zea mays L.</i>	Mazorcas	1,7	Mod. tolerancia
Pepino	<i>Cucumis sativus l.</i>	Producción	2,5	Mod. tolerancia
Berenjena	<i>Solanum melongena l.</i>	Producción	1,1	Mod. tolerancia
Ajo	<i>Allium sativum l.</i>	Producción de bulbo	3,9	Mod. tolerancia
Lechuga	<i>Lactuca sativa L.</i>	Producción	1,3	Mod. tolerancia
Melón	<i>Cucumis melo L.</i>	Producción	1	Mod. tolerancia
Cebolla	<i>Allium cepa L.</i>	Producción bulbo	1,2	Sensible
Guisante	<i>Pisum sativum L.</i>	Producción semillas	3,4	Mod. tolerancia
Pimiento	<i>Capsicum annum L.</i>	Producción	1,5	Mod. tolerancia
Patata	<i>Solanum tuberosum L.</i>	Producción tubérculos	1,7	Mod. tolerancia
Rábano	<i>Raphanus sativus L.</i>	Producción raíces	1,2	Mod. tolerancia
Espinaca	<i>Spincacea oleracea L.</i>	Producción hojas	2	Mod. tolerancia
Fresa	<i>Fragaria sp</i>	Producción	1	Sensible
Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Producción	2,5	Mod. tolerancia

Fuente: FAO, 2014.

La salinidad afecta a las plantas en dos formas: a) incapacitando a las raíces en la absorción de agua y b) provocando la inhibición de procesos bioquímicos y fisiológicos, como la absorción de nutrientes y su asimilación (Hasegawa et al., 2000; Munns, 2002; Munns y Tester, 2008). Los efectos de la salinidad antes descritos, afectan al crecimiento y supervivencia de la plantas. En las plantas los principales procesos, como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas o el metabolismo de los lípidos son severamente afectados por el estrés salino (Parida y Das, 2005). Durante una exposición inicial al

estrés salino las plantas experimentan un estrés hídrico, el cual provoca una reducción en la expansión foliar.

Los efectos osmóticos de la salinidad pueden observarse inmediatamente tras la aplicación de concentraciones salinas y estos aumentan con el tiempo de exposición, provocando la inhibición del desarrollo y de la división celular, así como también el cierre estomático (Munns, 2002; Flowers, 2004).

Durante la exposición continua a la salinidad las plantas experimentan el denominado estrés iónico, el cual provoca la senescencia prematura de las hojas más adultas y la reducción significativa del área foliar de las nuevas hojas (Creamer y Nowak, 1992). Los iones sodio y cloro son los que mayor daño causan; éstos afectan la actividad normal de las enzimas antioxidantes de las plantas, como por ejemplo la catalasa, la peroxidasa, la superóxido dismutasa, y provocan la hipertrofia celular, que es el aumento del tamaño de las células. La acumulación de iones de sodio en la hojas más adultas también provoca otras alteraciones como la clorosis y necrosis de estos tejidos, debido a su interferencia con la síntesis de proteínas y actividad de las enzimas (Hasegawa et al., 2000; Munns, 2002).

1.3.3. Tolerancia a la salinidad

Para comprender la respuesta de las plantas al estrés salino, Munns et al. (1995) describieron el proceso que se detalla en la Figura 3. Las especies sensibles, aquellas que no soportan niveles de salinidad, y las tolerantes a la salinidad difieren en el rango en el cual la concentración salina llega a provocar un efecto negativo en la tasa de crecimiento de la planta. La escala de tiempo es en días, semanas o meses, dependiendo de la especie y del nivel de salinidad. Durante la fase 1, se observa que en ambas especies la tasa de crecimiento se reduce por la adición del estrés salino, debido al estrés osmótico de la solución salina exterior a las raíces que limita la absorción de agua y de nutrientes, pero se mantiene una limitada actividad de expansión foliar y estomática. Durante la fase 2, la tasa de crecimiento se mantiene con pocos cambios en las especies tolerantes, mientras que en las especies sensibles la tasa de crecimiento se reduce aún más. La reducción de la tasa de crecimiento en las especies sensibles se debe a que el estrés osmótico a nivel radical es muy alto e impide mayoritariamente la absorción de

agua y nutrientes por parte de la planta, lo cual conlleva el cierre estomático, la falta de desarrollo foliar y la posterior muerte de la planta.

Mientras que, en las especies tolerantes la tasa de crecimiento se mantiene igual al observado en la fase 1, debido a la capacidad genética de la planta y a los mecanismos de respuesta ante el estrés salino como por ejemplo, el aumento de la actividad antioxidante, el aumento de compuestos osmoprotectores, la acumulación de sodio en las vacuolas o bien la eliminación de este ion a través de las hojas.

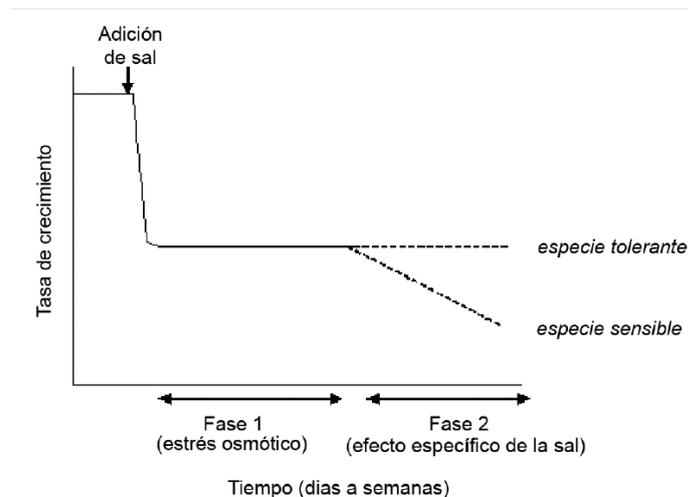


Figura 3. Esquema de la respuesta de las plantas al estrés salino.
Fuente: Munns et al., 1995.

1.3.4. Respuesta de las plantas al estrés salino

Los mecanismos de respuesta al estrés salino en plantas son muy complejos y aun no se conocen en su totalidad. Se han descrito varios genes que controlan la tolerancia a la salinidad en varias especies; su expresión depende, en gran parte, de las condiciones medioambientales y la respuesta también depende de la variación genética que muestran los genotipos (Allen et al., 1994). La tolerancia a la salinidad es analizada habitualmente como el porcentaje de producción de biomasa, porcentaje de materia seca, en las plantas expuestas a la salinidad frente a las cultivadas en su ausencia durante un periodo de tiempo, o bien, en términos de supervivencia de la población (Munns, 2002).

La tolerancia a la salinidad de una especie involucra también una aclimatación gradual a la salinidad y no la exposición directa a una concentración salina alta. Esta tolerancia puede mantenerse o disminuir dependiendo de la especie y del tiempo de exposición al estrés salino.

Las plantas en su continua evolución han desarrollado varios mecanismos para adaptarse a la salinidad y es posible distinguir tres tipos de respuesta de tolerancia: a) la tolerancia al estrés osmótico, b) la exclusión del ion sodio y c) la tolerancia a nivel de tejidos (Munns y Tester, 2008).

La tolerancia al estrés osmótico está limitada por el efecto osmótico de la salinidad que provoca la reducción de la tasa de crecimiento y cierre estomático. Este tipo de tolerancia involucra la habilidad de la planta a soportar la sequía causada por el estrés salino manteniendo activa la absorción de agua y de nutrientes, la expansión foliar y la actividad estomática (Rajendran et al., 2009). El segundo mecanismo de respuesta de las plantas al estrés salino es la exclusión del ion sodio a través de las hojas, la acumulación de sodio en las vacuolas y la limitación de la absorción del ion vía radical. La exclusión del ion sodio es un mecanismo de tolerancia que se basa en la capacidad de la planta para minimizar el efecto negativo mediante la secreción de sodio, evitando así su acumulación en el citosol de las células, particularmente en las hojas, órganos que poseen una tasa de transpiración alta (Munns y Tester, 2008; Rajendran et al., 2009). La acumulación de sodio en la vacuola consiste en transportar rápidamente los iones perjudiciales desde el citosol hacia la vacuola, consiguiendo así mantener el flujo de agua en las células y el crecimiento de las plantas bajo condiciones salinas (Munns y Tester, 2008).

Por otra parte, la menor acumulación de sodio en las hojas también está relacionada a una baja absorción de sodio por parte de las raíces; siendo este mecanismo de tolerancia el de mayor eficacia. La absorción del ion sodio es controlado a nivel radical por el plasmalema, el cual regula el paso de este ion al xilema. Los cultivares de patata de ciclo temprano acumulan el ion sodio en las hojas como mecanismo de respuesta al estrés salino, mientras que, los cultivares de ciclo más tardío no acumulan el sodio en las hojas pero sí en las raíces (Shaterian, et al., 2005). Bajo condiciones de estrés salino los cultivares tolerantes y tempranos de patata mostraron variación en el contenido del

ion K^+ y Na^+ en las hojas superiores sugiriendo que posiblemente los cultivares tardíos y tempranos poseen diferentes requerimientos nutricionales, de absorción y utilización del K^+ y Na^+ bajo condiciones de salinidad (Shaterian, et al., 2005).

La tolerancia a nivel de tejidos involucra una mayor supervivencia de las hojas más adultas. La compartimentación del sodio y cloro tanto a nivel intra como extra celular evita alcanzar niveles tóxicos en el citoplasma, especialmente en las células del mesófilo de las hojas debido a la síntesis y acumulación de solutos osmoreguladores en el citoplasma (Munns y Tester, 2008). La función de los solutos osmoreguladores es el ajuste osmótico, que consiste en mantener el agua dentro de las células, proteger las enzimas de la desnaturalización y actuar como reservorio de energía y nitrógeno durante la exposición a la salinidad (Ashraf y Fooland, 2007). La función de estos solutos no sólo se limita a mantener un balance osmótico; algunos de ellos, con capacidad hidrofílica, pueden reemplazar el agua de las superficies de las membranas o actúan como proteínas chaperonas de bajo peso molecular para proteger las estructuras celulares eliminando el estrés oxidativo (Hasegawa et al., 2000).

Por otra parte estudios recientes muestran el papel de la activación del sistema de defensa natural de las plantas como respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, como la salinidad y la sequía (Rai et al., 2011). La activación del sistema de defensa de las plantas frente al estrés osmótico involucra la síntesis de ciertos metabolitos que permiten proteger las estructuras celulares, facilitar la eliminación de los iones responsables de la salinidad y aumentar la respuesta antioxidante de las plantas. Ramakrishna y Ravishankar (2011) presentan una recopilación indicativa de la importancia que tienen diversos metabolitos de las plantas en respuesta al estrés salino (Tabla 2).

Tabla 2. Metabolitos de los vegetales relacionados con el estrés salino en plantas.

Metabolito detectado	Especie de la planta	Nº Referencias encontradas
Ácido jasmónico	<i>Lycopersicon esculentum</i>	21
Alcaloides tropanicos	<i>Datura innoxia</i>	144
Antocianinas	<i>Grevillea spec.</i>	17
Flavonoides	<i>Hordeum vulgare</i>	142
GABA	<i>Sesamun indicum L.</i>	141
Glicina betaina	<i>Trifolium repens</i>	146
Glicina betaina	<i>Triticum aestivum</i>	148
Poliaminas	<i>Orzya sativa</i>	147
Polifenoles	<i>Cakile marítima</i>	143
Sacarosa y almidón	<i>Cenchrus pennisetiformis</i>	149
Sorbitol	<i>Lycopersicon esculentum</i>	140
Trigonelina	<i>Glycine max</i>	145

Fuente: Ramakrishna y Ravishankar, 2011.

1.3.5. Importancia de la prolina frente al estrés salino

La prolina es un aminoácido importante del metabolismo primario de las plantas (Hasegawa et al., 2000; Ashraf y Fooland, 2007; Szabados y Saviouré, 2009) que se detectó por primera vez en la gramínea *Lolium perenne* (Kemble y Mac Pherson, 1954), a partir de aquí, varios estudios han demostrado que el contenido de prolina en las plantas aumenta cuando son expuestas a diferentes tipos de estrés, como la sequía, la salinidad, la radiación U.V, los metales pesados, el estrés oxidativo y el estrés biótico (Hasegawa et al., 2000; De Lacerda et al., 2003; Mishra y Dubey, 2006; Ashraf y Fooland, 2007; Carrillo et al., 2008; Szabados y Saviouré, 2009). La prolina tiene la función de actuar como chaperona molecular con capacidad de proteger la integridad de las proteínas y fortalecer la actividad enzimática de varias enzimas. La acumulación de este aminoácido ocurre en el citosol, donde contribuye principalmente al ajuste osmótico, a la estabilización de las proteínas y membranas celulares, a proteger a las plantas de la acumulación de los radicales libres y a mantener la relación adecuada de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Jaarsma et al., 2013).

El papel de la prolina en la osmoregulación y tolerancia a la salinidad ha sido cuestionado en numerosas ocasiones. En Soja, *Glycine max*, Moftah y Michel (1987) sugieren que la prolina no debe ser utilizada como indicador de la tolerancia a la salinidad al no encontrar variaciones en sus niveles en planta respecto a plantas control

sin tratar; Ashraf (1989) observó la relación negativa entre la acumulación de prolina y la tolerancia al estrés salino en *Vigna mungo*. En la misma línea, Colmer et al. (1995) no encontraron relación significativa entre la acumulación de prolina y la tolerancia a la salinidad en trigo, *Triticum vulgare*. Por su parte, Lutts et al. (1996) y Garcia et al. (1997) determinaron que la prolina no interviene en el ajuste osmótico en plantas de arroz, *Oryza sativa*, cultivadas con estrés salino y su acumulación se interpretó como síntoma de daño en vez de indicador de la tolerancia a la salinidad.

Por otra parte, se ha encontrado mayor acumulación de prolina en plantas tolerantes respecto a las sensibles a la salinidad en numerosas especies. Ahmad et al. (1981) observaron que los cultivares tolerantes a la salinidad de *Agrostis stolonifera* acumularon más prolina que los cultivares sensibles. Madan et al. (1995) también encontraron mayor acumulación de prolina en un cultivar de *Brassica juncea* tolerante a la salinidad que en un cultivar sensible cultivados bajo estrés salino. Petrusa y Winicov (1997) demostraron que las variedades de alfalfa, *Medicago sativa*, tolerantes a la salinidad rápidamente doblaron el contenido de prolina mientras que en las menos tolerantes el incremento fue menor bajo condiciones de estrés salino de hasta 171mM de NaCl. De forma contraria, Lutts et al. (1996) observaron que los cultivares de arroz, *Oryza sativa*, tolerantes a la salinidad acumularon menos prolina en las hojas respecto a los cultivares sensibles cuando se cultivaron con una salinidad de hasta 50mM de NaCl.

La acumulación de prolina en los tejidos vegetales como mecanismo de respuesta o de protección ante situaciones de estrés aun permanece cuestionado debido a la disparidad de las respuestas, en el contenido de prolina, encontradas en diferentes especies expuestas a diferentes tipos de estrés (Ashraf y Harris, 2004; Szabados y Savouré, 2009). Por ejemplo, la acumulación de prolina es una característica en monocotiledoneas expuestas al estrés salino; excepto en cebada, *Hordeum vulgare*, en que la salinidad parece no afectar a la acumulación de prolina (Yamaya y Matsumoto, 1989). Sin embargo, en general, se presenta una acumulación de prolina en varias especies vegetales al exponer las plantas a estrés salino (Szabados y Savouré, 2009).

La biosíntesis de la prolina es activada y su catabolismo es reprimido durante la deshidratación de las plantas, mientras que la rehidratación activa la regulación opuesta (Szabados y Saviouré, 2009). El metabolismo de la prolina incluye una recíproca regulación de los genes de la biosíntesis de la prolina P5SC y del gen relacionado con su degradación de PDH (Szabados y Saviouré, 2009). Durante la exposición al estrés salino los genes P5SC se inducen, mientras que el gen PDH es reprimido; la expresión de los genes P5SC ha demostrado estar fuertemente relacionada con la acumulación de prolina, particularmente en presencia de 100mM de NaCl, e incrementan la tolerancia a la salinidad y la producción de tubérculos de patata bajo condiciones de estrés salino (Hmida-Sayari, 2005; Jaarsma et al., 2013).

La biosíntesis de la prolina en las plantas es controlada por la actividad de dos genes, (P5CS1 y P5CS2), que codifican la pirrolina-5-carboxilasa sintetasa. Estos genes han demostrado estar involucrados en la activación de la división meristemática de tejidos en tallos y raíces, en inflorescencias y en el cultivo de células. La expresión de ambos genes también se ha observado en meristemas florales, supliendo prolina para el desarrollo floral (Mattioli et al., 2008). La expresión del gen P5CS2 se ha identificado tras la aplicación de SA, en las señales de respuesta de las (ROS) que activan una respuesta hipersensible en *Arabidopsis sp.* La expresión del gen P5CS1 es inducida por el estrés osmótico y salino, y es activada por un gen ABA dependiente y otro gen ABA insensible 1 controlado que están relacionados con las señales regulatorias del ABA y del H₂O₂ bajo situaciones de estrés (Ashraf y Fooland, 2007; Szabados y Saviouré, 2009).

1.3.6. Importancia de las enzimas antioxidantes frente al estrés salino

Las especies reactivas al oxígeno o (ROS) (del inglés Reactive Oxygen Species) son compuestos altamente deletéreos que se producen como consecuencia de procesos de transferencia de energía, así como en otros procesos fisiológicos con frecuencia relacionados con factores adversos al ambiente (Mittler, 2002; Backhausen et al., 2005). Los organismos y en particular las plantas, no solo han desarrollado sistemas para protegerse de estos agentes tóxicos sino que también son capaces de aprovechar las propiedades reactivas de estas moléculas para utilizarlas como señales reguladoras de diferentes procesos (Backhausen, et al., 2005; Carretero, et al., 2007).

La alta reactividad de las ROS determina que tengan en general una vida corta y que atraviesen con dificultad las membranas de la célula (Mittler, 2002; Cavalcanti, et al., 2007). Ello hace que su función reguladora venga definida por el balance producción/detoxificación. La acumulación de estos compuestos en diferentes compartimentos de la célula contribuye a limitar su efecto deletéreo y permite que su función específica se realice de manera controlada. Los principales compuestos ROS detectados en la respuesta ante factores estresantes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y son producidos de manera característica fuera de la membrana plasmática de las células vegetales, en el apoplasto (Stoddard, et al., 2006; Tuteja, 2007). Aunque la producción de ROS ocurre principalmente en el apoplasto, existen otros compartimentos celulares donde se acumulan ROS que pueden influir en la interacción de la planta con el medio ambiente. Niveles elevados de ROS se producen como resultado de anomalías en la transferencia de energía en la cadena respiratoria mitocondrial, pero sobre todo de forma asociada a la fotosíntesis y a la fotorespiración en los cloroplastos y peroxisomas de la célula vegetal (Molinier, et al., 2006).

Las enzimas antioxidantes son los componentes más importantes que intervienen en la eliminación de las ROS (Meloni, et al., 2001). Altas concentraciones de NaCl causan toxicidad y desequilibrio celular debido al exceso de iones de Na y Cl en las células, favoreciendo el estrés osmótico y el incremento de ROS (Alscher, et al., 1997; Benavides, et al., 2000). Para mitigar este efecto destructivo, las plantas han desarrollado su sistema de defensa antioxidante, enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la peroxidasa (POD), la glutatión reductasa (GR), ascorbato la peroxidasa (APX), la catalasa (CAT) y otros mecanismos de defensa no enzimáticos como el glutatión, el ácido ascórbico y los carotenoides (Piqueras, et al., 1998; Stepien y Klobus, 2005; Mandhania, et al., 2006).

Una correlación entre la actividad antioxidante y la tolerancia a la salinidad ha sido demostrada en dos clones de patata, uno sensible y el otro tolerante a la salinidad, mostrando que la actividad de catalasa del clon tolerante fue significativamente superior a la del clon sensible cuando estos se cultivaron en ausencia de NaCl. Al someterlos a concentraciones de 100 y 150mM de NaCl la actividad de catalasa en el clon tolerante se mantuvo sin cambios, mientras que en el clon sensible la actividad de catalasa disminuyó respecto al control (Benavides, et al., 2000).

Así mismo, el incremento de la actividad enzimática de la catalasa y peroxidasa está relacionada con la tolerancia a la salinidad y ha sido observada en plantas de *Jatropha curcas* (Gao, et al., 2008), en maíz (Aragao, et al., 2012), en *Plantago maritima* y en *Plantago media* (Turkan, et al., 2013).

La actividad de la superóxido dismutasa y de la peroxidasa fue evaluada en cuatro cultivares de arroz sensibles y tolerantes a la salinidad, observando que los cultivares sensibles redujeron la actividad de la superóxido dismutasa y aumentaron la actividad de la peroxidasa cuando se sometieron a un tratamiento de 1,2mM de NaCl o 12dS/m, mientras que los cultivares tolerantes a la salinidad apenas mostraron un ligero incremento y disminución en las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa y de la peroxidasa, respectivamente (Donisio-Sese y Tobita, 1998). El incremento en la actividad enzimática de la CAT y la POD se observó al exponer plántulas de remolacha, *Beta vulgaris*, a 500mM de NaCl en invernadero (Bor, et al., 2003). La actividad de POD también tuvo un aumento importante respecto al control en las plantas de judía, *Vigna unguiculata*, expuestas a 200mM de NaCl, mientras que la actividad de la CAT se redujo significativamente a la mitad respecto al control (Cavalcanti, et al., 2004).

La actividad POD en hojas de caléndula, *Calendula officinalis*, se redujo en un 28% con la aplicación de 100mM de NaCl, mientras que la actividad de la enzima en las raíces aumentó en un 55%. Al contrario de lo observado en la POD, la actividad de la CAT se incrementó en un 25% en las hojas y se redujo en un 43% en las raíces (Nader, et al., 2004). En plantas de sésamo, *Sesamum indicum*, la actividad de la POD y de la CAT aumentó significativamente respecto al control al exponerlas a 100mM de NaCl (Koca, et al., 2007).

Plantas de verdolaga, *Portulaca oleracea*, sometidas a estrés salino de 70 y 140mM de NaCl mostraron una disminución en la actividad POD en un 13 y 30% respectivamente, mientras que la CAT solamente aumentó su actividad 2,5 veces en el tratamiento de 140mM de NaCl (Yazici, et al., 2007). En resumen, en diferentes investigaciones se ha comprobado que al incrementar la concentración de NaCl se producen cambios en la actividad enzimática de la CAT y de la POD incrementando o disminuyendo según las especies y las condiciones de ensayo, lo cual indica que el mecanismo de tolerancia a

salinidad permanece todavía sin aclarar y por lo cual más estudios son necesarios para elucidar su función y especialmente en la planta de patata.

1.4. REGULACIÓN HORMONAL DE LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS

Una hormona vegetal es una sustancia que siendo producida en muy pequeñas cantidades en cualquier parte del organismo vegetal es transferida a otras partes del mismo para actuar en procesos fisiológicos específicos del desarrollo. Las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico, y los recientemente identificados brasinosteroides, jasmonatos y salicilatos son las hormonas vegetales que hasta hoy en día se conocen. Su síntesis y acumulación en la planta están reguladas para actuar como mensajeros químicos a concentraciones muy bajas, del orden micro y nanomolar.

Las hormonas vegetales se transportan por la planta y se mueven a distancias cortas entre las células partiendo de los sitios de síntesis para ejercer su papel en las células específicas. La variación de las concentraciones de hormonas vegetales en la planta provoca alteraciones en la expresión génica; estos cambios de concentración de las hormonas también afectan a los procesos fisiológicos de desarrollo de la planta. Las hormonas vegetales afectan a todas las fases de la vida de la planta y su respuesta al estrés ambiental, tanto biótico como abiótico (Taiz y Zeiger, 2010). Los salicilatos, jasmonatos, etileno y ácido abscísico regulan las respuestas a situaciones adversas, pero dependiendo del tipo de estrés, la respuesta estará mediada por una u otra hormona vegetal, llegando a mostrar compatibilidad entre algunas de ellas o bien actuar de forma antagonista. De esta forma, si la planta ha generado una respuesta ante un estrés biótico mediante una hormona vegetal específica, la planta difícilmente podrá responder al mismo tiempo a un estrés abiótico (Wasilewska et al., 2008).

Estudios previos han demostrado que el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno tienen un papel importante en la respuesta de la planta frente al ataque de patógenos. El SA está relacionado con las respuestas de defensa contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos; así como también en el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR). Por otra parte el JA y el etileno están relacionados con la respuesta de defensa frente a patógenos necrotrofos y herbívoros, activando la

resistencia sistémica inducida (SIR). Por su parte el ácido abscísico (ABA) se ha citado que está involucrado en la respuesta de la planta frente a factores abióticos, como temperaturas bajas, sequía y estrés osmótico; el ABA parece tener una función negativa frente al ataque de patógenos, acción opuesta a la observada con los salicilatos, jasmonatos y etileno (Vlot et al., 2009).

La comprensión de la respuesta de las plantas a un estímulo biótico o abiótico es compleja, pues ante este estímulo externo la planta desencadena la activación de múltiples vías de señales mediadas por las hormonas vegetales y que tienen complejas interacciones entre sí. Son estas interacciones las que probablemente han evolucionado como mecanismos de respuesta que han permitido la supervivencia de las plantas mediante los procesos metabólicos apropiados. En las plantas, los genes de defensa responsables de la respuesta son activados por la interacción planta - patógeno, o bien por las condiciones medioambientales desfavorables.

En el primer caso, en la interacción planta - patógeno, la respuesta depende los factores de resistencia de la planta y los de virulencia del patógeno. Por contra para el caso de estrés abiótico la respuesta depende de la capacidad de la planta para detectar los estímulos estresantes del ambiente. Esto sugiere la existencia de una red de señalización compleja que permite a la planta reconocer y protegerse contra factores estresantes.

Varios estudios revelan que el calcio y las especies reactivas al oxígeno (ROS) son mensajeros secundarios en la respuesta temprana a estreses bióticos y abióticos. Por ejemplo, el contenido de calcio en el citosol es mayor cuando las plantas son expuestas a condiciones medioambientales adversas, al ataque de patógenos, al estrés osmótico, al estrés hídrico, al frío y a los daños mecánicos (Hamdia y Shaddad, 2010). Las estrategias de defensa de las plantas generalmente se encuentran divididas en dos grandes grupos: las que presentan una defensa constitutiva y que generalmente involucran un coste energético alto y las defensas inducibles cuyo coste energético es menor (Karban et al., 1997).

Dependiendo del coste energético generado por la planta para hacer frente a un estrés, este puede tener mayor o menor repercusión sobre el desarrollo y producción de la planta. Las defensas constitutivas también incluyen las estructuras de protección física (espinas, tricomas, pubescencia) y la producción y almacenamiento de compuestos del

metabolismo secundario (alcaloides, glucosinolatos, terpenos y fenoles) en los tejidos vegetales. Las defensas inducibles consisten en la producción de compuestos *de novo* del metabolismo secundario (alcaloides, glucosinolatos, terpenos y fenoles) y compuestos que inhiben la digestión, en el caso de herbívoros como los inhibidores de proteínasa (PIs), únicamente cuando existe la interacción de la planta con el factor causante del estrés (Wittstock y Gershenzon, 2002). El éxito de las defensas inducibles radica en que permiten a la planta responder más rápido y con más fuerza ante una situación de estrés. Este tipo de respuesta está mediada por los genes de resistencia o tolerancia, las proteínas quinasas (MAPK's) y la acción individual o coordinada con las hormonas vegetales (Cipollini et al., 2003; Conrath et al., 2006).

1.4.1. Jasmonatos

Los jasmonatos son compuestos ciclopentanos derivados del ácido α -linolénico y reconocidos como hormonas vegetales. Dentro del grupo de los jasmonatos se incluye el grupo de ácidos grasos oxigenados denominados oxilipinas, con el ácido jasmónico como el principal precursor de estos compuestos (Creelman y Mullet, 1997; Acosta y Farmer, 2010). El metil jasmonato (MeJa) se aisló por primera vez no como hormona vegetal sino por sus propiedades como aroma, aceite esencial del jazmín, *Jasminum grandiflorum* (Demole et al., 1962). Los jasmonatos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y también son producidos por algunos hongos, el primer aislamiento del ácido jasmónico de un cultivo filtrado de *Lasio diplodia theobromae* fue descrito por Aldridge et al. (1971).

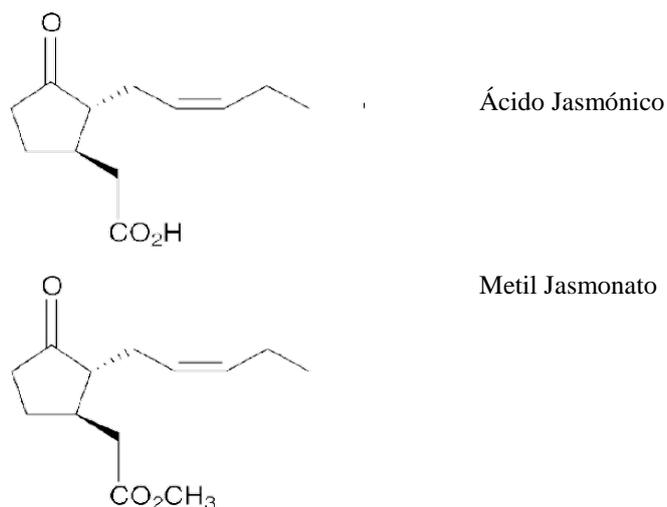


Figura 4. Estructura del ácido jasmónico to y del metil jasmonato
Fuente: Creamer y Novak, 1997.

El ácido jasmónico es un derivado de los ácidos grasos poli-insaturados linoléico y hexadecatrienónico, los cuales son almacenados en los plástidos, principalmente en forma de monogalactoglicerol (MGDG). La 13 lipogenasa (13-LOX) aporta oxígeno molecular al ácido linoléico (18:3) y al ácido hexadecatrienónico a partir de sus hidroperóxidos, el ácido 13(S)-hidroperoxi-octadecatrienónico (13-HPOT) y el ácido 11(S)-hidroperoxi-hexadecatrienónico (11-HPHT). La enzima Aleno óxido sintetasa (AOS) transforma estos compuestos en el ácido (13S)-12,13-epoxi-octadecatrienónico (12,13-EOT) y en el ácido (11S)-10,11-epoxi-octadecatrienónico (10,11-EOT). La enzima Aleno óxido ciclasa dirige la formación de un anillo ciclopentano para producir el ácido 12-oxo-fitodienónico (OPDA) y el ácido dino-oxo-fitotodienónico (dnOPDA) (Creamer y Novak, 1997).

El OPDA y el dnOPDA se esterifican a galactolípidos en forma de arabidopsidos, los cuales a día de hoy han sido aislados de *Arabidopsis* y en otras crucíferas relacionadas. Es posible que estos arabidópsidos sean sintetizados por una acción directa de la 13-LOX, AOS y AOC en MGDG. El OPDA y dnOPDA son transferidos a los peroxisomas, al menos parcialmente a través de la acción del transportador tipo ABC COMATOSE (CTS). La enzima OPDA reductasa 3 cataliza el anillo ciclopentano en OPDA y dnOPDA para formar los ácidos 3-oxo-2-(2-(Z)-pentanil)-ciclopentano-1-octanónico (OPC-8:0) y hexanónico (OPC-6:0), respectivamente. La enzima OPC-8: CoA ligasa 1 (OPCL1) esterifica la coenzima A (CoA) al grupo acil de OPC-8:0 y

posiblemente OPC- 6:0 en preparación de ciclos de oxidación β que acortan la cadena ácida de estos compuestos para producir el ácido jasmónico. La β oxidación se realiza a través de tres tipos de enzimas: la acil-CoA oxidasa (ACX), una proteína multifuncional (MPF, la cual produce la actividad de la enoil-CoA hidratasa y β -hidroxi-acil-CoA dehidrogenasa), y la enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa (KAT). Finalmente, una acil-tioesterasa (ACH) libera el ácido (+)-7-iso-jasmónico (JA) a partir de su éster CoA. El transporte del JA al citoplasma se produce mediante la esterificación al metil (+)-7-iso-jasmonato o por conjugación aminoácida para formar el (+)-7-iso-jasmonoil-isoleucina el cual es considerado como la hormona activa (Creamer y Novak, 1997).

1.4.2. Efectos de los jasmonatos en las plantas

Los jasmonatos actúan como elicitores de las repuestas de las plantas ante varias situaciones de estrés como: el ataque de insectos, heridas, infección por patógenos, daño U.V, sequía y salinidad (Qi et al., 2011) y afectan a una gran variedad de procesos como la maduración de frutos, la viabilidad en la producción de polen, el crecimiento de las raíces (Creelman y Mullet, 1997; Acosta y Farmer, 2010), la tuberización de patata, el incremento de altura, el área foliar, la cantidad de raíces, el peso fresco y seco de explantos de patata y de otras hortícolas (Pelacho y Mingo-Castel, 1991; Toro, 2003; Martín-Closas, 2007).

Las respuestas de defensa se inician a través del reconocimiento entre el elicitador, en este caso el MeJa, y el receptor localizado en la membrana plasmática o en el citosol de la célula vegetal. Este proceso permite la activación de las respuestas de defensa, seguido de la amplificación de la señal mediante una cascada de mensajeros secundarios, lo cual finalmente resulta en una respuesta de defensa que incluye la producción e incremento de compuestos del metabolismo secundario, como por ejemplo compuestos fenólicos y fitoalexinas. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos que se acumulan en algunas plantas en altas concentraciones después de infecciones bacterianas o fúngicas y que ayudan a limitar la colonización del patógeno. Por otra parte, la producción de especies reactivas al oxígeno ROS es un evento común en las respuestas de defensa de las plantas, siendo el superóxido (O_2^-) y peróxido H_2O_2 las especies más abundantes. Estos compuestos exhiben una amplia variedad de acciones, incluyendo la reacción hipersensible, la muerte celular y el fortalecimiento de la pared celular. El superóxido y

el peróxido también han sido descritos como señales involucradas en la inducción de fitoalexinas en diferentes especies (Perrone et al., 2003). En tomate se ha demostrado que el peróxido está involucrado en las respuestas de defensa a diferentes elicitores, incluyendo el MeJa (Orozco-Cardenas et al., 2001; Neill et al., 2002; Hung y Kao, 2003 y 2004; Hung et al., 2006).

Estudios recientes han demostrado la acción elicitora o protectora del MeJa frente al estrés salino. Plántulas de guisante, *Pisum sativum*, pre tratadas con MeJa mostraron una menor acumulación de sodio y cloro en las hojas, demostrando una acción protectora de este jasmonato frente al estrés salino (Yoon et al., 2009; Del Amor y Cuadra-Crespo, 2011). Es conocido que el metil jasmonato inhibe la apertura estomática, lo cual reduce la tasa de transpiración (Hossain et al., 2011). La disminución de la tasa de respiración es la que puede limitar el transporte de los iones de sodio y cloro desde la raíz hacia el tallo (Hossain et al., 2011). Por otra parte el metil jasmonato aumenta el contenido de prolina en los tejidos vegetales, lo cual regula el balance osmótico en las células, el cierre estomático, permitiendo así una menor transpiración de la planta y por ende una menor absorción de las sales; sugiriendo que el MeJa posiblemente actúa como elicitor o protector, aumentando el contenido de prolina, lo cual, podría aumentar la tolerancia al estrés salino en plantas (Fedina y Tsonev, 1997).

En la figura 5 se observan las repuestas de señalización del ácido jasmónico y de los jasmonatos en general en vegetales frente a diversos tipos de estrés biótico, como el ataque de patógenos, herbívoros e incluso actuando en favor de la planta mediante la atracción de predadores y fauna benéfica para contrarrestar el ataque de herbívoros; y también frente al estrés abiótico, como el salino (Tsonev et al., 1998; Abdala et al., 2003), el osmótico (Kramell et al., 1995), el hídrico (Wang, 1999), el inducido por bajas temperaturas (Lee et al., 1996) y por metales pesados (Xiang y Oliver, 1998). Además la aplicación exógena de jasmonatos provoca otros efectos sobre el crecimiento y desarrollo radical, y en la inhibición de la germinación.

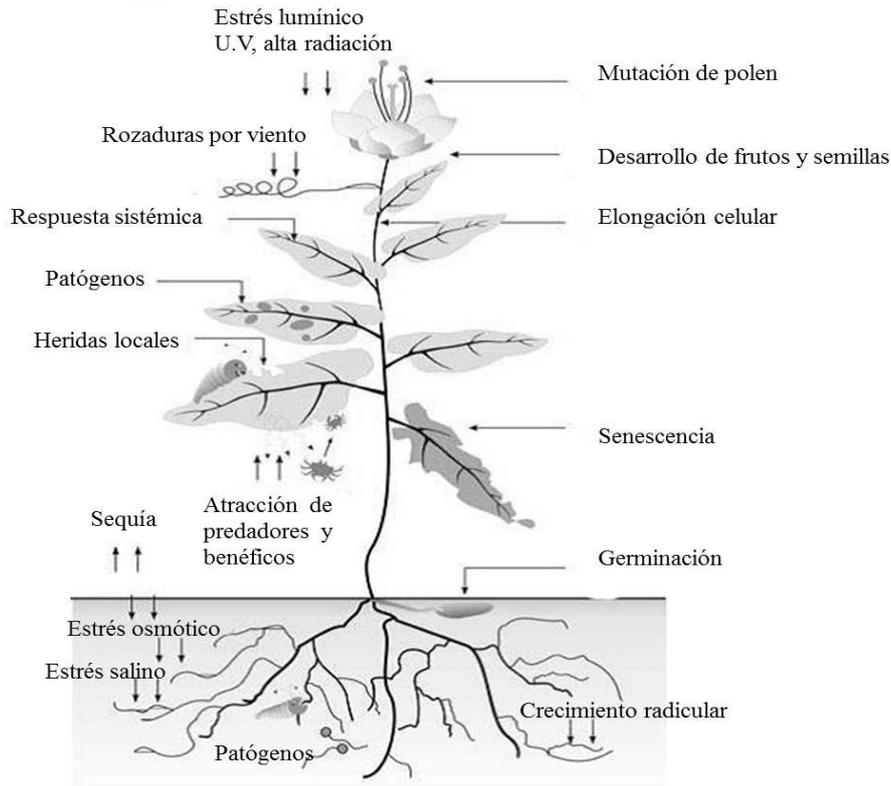


Figura 5. Señalización de las respuestas del ácido jasmónico y de los jasmonatos en general en el desarrollo de las plantas y ante situaciones de estrés biótico y abiótico.

Fuente: Wasternack 2007.

Dada la importancia del cultivo de la patata para la alimentación humana y los efectos negativos de la salinidad, que sobre su cultivo, este trabajo de investigación pretende profundizar en el conocimiento de la fisiología del estrés salino, el posible efecto protector del metil jasmonato y su relación con el contenido del aminoácido prolina y la actividad antioxidante para mitigar los efectos negativos de la salinidad en cuatro cultivares de patata con diferente ciclo de maduración.

1.5. REFERENCIAS

Abdala, G; Miersch, O; Kramell, R; Vigliocco, A; Agostini, E; Forchetti, G y Alemano, S. 2003. Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Journal of Plant Growth Regulation* 40: 21-27.

Acosta, F. I. y Farmer, E. 2010. Jasmonates. *The Arabidopsis book 8: American Society of Plant Biologists* 1-13p.

Ahmad, I; Wainwright, S y Stewart, G. 1981. The solute and water relations of *Agrostis stolonifera* ecotypes differing in their salt tolerance. *New Phytologist* 87: 615-629.

Aldridge, D; Galt, S. y Turner, W. 1971. Metabolites of *Lasioidiploidia theobromae*. *Journal of Chemical Society* 1: 1623-1627.

Alva, K. A; Moore, D.A y Collins, P. H. 2012. Impact of deficit irrigation on tuber yield and quality of potato cultivars. *Journal of Crop Improvement* 26: 211-227.

Ali Dib, T; Monneveux, P y Araus, J. 1990. Breeding durum wheat for drought tolerance. Analytical, synthetical approaches and their connections. *In: Symposium on wheat breeding. Prospects and future approaches*. Varna-Bulgaria, 1-33p.

Allen, J; Chambers, J y Stine, M. 1994. Prospects for increasing the salt tolerance of forest trees: A review. *Tree Physiology* 14 (7-8-9): 843-853.

Alscher, R; Donahue, J. y Cramer, C. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100(2): 224-233.

Appacale, 2008. *Consulta cultivares patata de España* [Consulta correo electrónico] 2008.

Aragao, F; Gomez, E; Costa, J; Mendes, N y Prisco, J. 2012. Catalase play a key rol in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* 56: 62-71.

Ashraf, M. 1989. The effect of NaCl on water relations, chlorophyll, and protein and proline contents of two cultivars of blackgram (*Vigna mungo* L.), *Plant Soil* 119: 205-210.

Ashraf, M y Harris, P, J. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166:3-16.

- Ashraf, M, y Fooland, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59(2): 206-216.
- Backhausen, J; Klein, M; Klocke, M y Jung, S. 2005. Salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée) plants depends on light intensity and air humidity. *Plant Science* 169(1): 229-237.
- Benavides, M; Marconi, P; Gallego, A; Comba, M y Tomaro, M. 2000. Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 27(3): 273-278.
- Bor, M; Ozdemir, F y Turkan, I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugarbeet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science* 164(1): 77-84.
- Carretero, C; Cantos, M; Garcia, J y Troncoso, A. 2007. In vitro-ex vitro salt (NaCl) tolerance of cassava (*Manihot esculenta* sp. Crantz) plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 43(4): 364-369.
- Carrillo, P; Mastrodonato, G; Nacca, F; Parisi, D; Verlotta, A y Fuggi, A. 2008. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology* 35(5): 412-426.
- Cavalcanti, F; Oliveira, J; Martins-Miranda, A; Viegas, R y Silveira, J. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist* 163(3): 563-571.
- Cavalcanti, F; Santos Lima, J; Ferreira-Silva, S; Viegas, R y Silveira, J. 2007. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *Journal of Plant Physiology* 164(5): 591-600.
- CIP. 2014. *Datos y cifras sobre la papa*. [En línea]. www.cippotato.org. [Último acceso: 21 2014].
- Cipollini, D; Purrington, C y Bergelson, J. 2003. Cost of induced responses in plants. *Basic Applied Ecology* 4: 79-85.
- Colmer, T; Epstein, E y Dvorak, J. 1995. Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum* (Host.) A. Love amphiploid. *Plant Physiology* 108: 1715-1724.

- Conrath, U; Beckers, G J; Flors, V; García, Agustín P; Jakab, G; Mauch, F; Newman, M A; Pieterse, C M; Poinssot, B; Pozo, M J; Pujin, A; Schaffrath, V; Ton, J; Wendehenne, D; Zimmerli, L y Mauch-Mani, B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19(6):1062-1071.
- Creamer, G y Nowak, R. 1992. Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt stressed barley. *Physiologia Plantarum* 84(4): 600-605.
- Creelman, R y Mullet, J. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- De Lacerda, C. F; Cambraia, J; Oliva, M. A; Ruiz, H. A y Prisco, J. T. 2003. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49(2): 107-120.
- Del amor, F y Cuadra-Crespo, P. 2011. Alleviation of salinity stress in broccoli using foliar urea or methyl jasmonate, analysis of growth, gas exchange and isotope composition. *Plant Growth Regulation* 63(1): 55-62.
- Demole, E; Lederer, E y Mercier, D. 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, cosntituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica XLV*: 675-685.
- Dodds, J. H; Huaman, Z y VanderZaag, P. 1991. Potato germoplasm conservation. En: J. Dodds, ed. *In vitro methods for conservation of plant genetic resources*. London: Chapman & Hall 93-109.
- Donisio-Sese, M y Tobita, S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135(1): 1-9.
- Donnelly, D; Coleman, W y Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research* 80: 103-115.
- FAO, 2011. *FAOSTAT. Estadísticas de cultivos por países*. [En línea] www.faostat.org [Último acceso: 2 01 2014].
- FAO, 2014. *FAOSTAT. Estadísticas de cultivos por países*. [En línea] www.faostat.org [Último acceso: 2 01 2014].
- Fedina, I. S y Tsonev, T. D. 1997. Effect of pretreatment with methyl jasmonate on the response of *Pisum sativum* to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 151: 735-740.

- Flowers, T. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55(396): 307-319.
- Gao, S; Ouyang, S; Wang, Y; Xu, L y Tang, F. 2008. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenilalanine ammonic lyase activities in *Jartropha curcas* L. seedlings. *Plant Soil and Environment* 54(9): 374-381.
- Garcia, A, B; Almeida-Engler, J; Lyer, S; Gerats, S; Van Montagu, M y Caplan, A. 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiology*. 115: 159-169.
- Gopal, J e Iwama, K. 2007. In vitro screening of potato against water-stress mediated throught sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports* 26: 693-700.
- Gopal, J y Minocha, J. L. 1998. Effectiveness of in vitro selection for agronomic characters in potato. *Euphytica* 103: 67-74.
- Green, W. 1989. The effects of soil compactation and soil water on the yield of Norgold Russet Potatoes. *Thesis Master of Science*, Texas Tech University 60p.
- Hamdia, M. A y Shaddad, M. K. 2010. Salt tolerance of crop plants. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 6(3): 64-90.
- Harris, P. M. 1978. *The potato crop*. 1 ed. London: Chapman and Hall Ltd. 730p.
- Hasegawa, P; Bresa, R; Zhu, J y Bohnert, H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Haverkort, A. 1986. Manejo del agua en la producción de papa. Boletín de información técnica 15. Lima-Perú. Editorial agropecuaria hemisferio sur. Centro Internacional de la Papa. 24p.
- Hawkes, J. 1992. *The potato crop*. Second ed. New York: Chapman & Hall. 909p.
- Hmida-Sayari, A; Gargouri-Bouزيد, R; Bidani, A; Jaoua, L y Savoure, A. 2005 Overexpression of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science* 169: 746-752.
- Hopkins, W y Hüner, N. 2008. Introduction to plant physiology. Fourth ed. New York: Wiley & Sons. 528p.

- Hossain, M. A; Munemasa, S; Uraji, M; Nakamura, Y; Mori, I y Murata, Y. 2011. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-Induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156: 430-438.
- Hung , K. T; Hiu, Y. T y Kao, C. H. 2006. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate senescence of rice leaves. *Physiologia plantarum* 127: 293-303.
- Hung, K. T y Kao, C. H. 2003. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Journal of Plant Physiology* 160: 871-879.
- Jaarsma, R; Rozemarijn, S y H. de Boer, A. 2013. Effect of salt stress on growth, Na⁺ accumulation and proline metabolism in Potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *PLoSone* 8(3):1-10.
- Karban, R; Agrawal, A. y Mangel, M. 1997. The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology* 78(5): 1351-1355.
- Katerji, N; Van, H; Hamdy, J. W y Mastrorilli, M. 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management* 43: 99-109.
- Kemble, A. R. y MacPherson, H. T. 1954. Liberation of amino acids in perennial ray grass during wilting. *Biochemical Journal*. 58: 46-59
- Koca, H; Bor, M; Ozdemir, F y Turkan, I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 60: 344-351.
- Kramell, R; Atzorn, R; Schneider, G; Miersch, O; Brucknet, C; Schmidt, J; Sembder, G y Parthier, B. 1995. Occurrence and identification of jasmonic acid and its aminoacid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 29-36.
- Lee, T. M; Lur, H. S; Lin, Y. H y Chu, C. 1996. Physiological and biochemical changes related to methyl jasmonate-induced chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell and Environment* 19: 65-74.
- León, J. C. 2010. *Plan Estratégico del sector de la patata en Castilla y León 2010-2013*. Ayuntamiento de Castilla y León.
- Levitt, J. 1980. *Responses of plant to environmental stresses*. Second ed. New York: Academic Pres. 697p.

- Lutts, S; Kinet, J, M y Bouharmont, J. 1996. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Plant Growth Regulation* 19: 207-218.
- Madan, S; Nainawatee, H; Jain, R y Chowdhury, J. 1995. Proline and proline metabolizing enzymes in in vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress, *Annals of Botany* 76: 51-57.
- Maggio, A; Hasegawa, P; Bressan, R; Consiglio, M. F y Joly, R. J. 2001. Unravelling the functional relationship between root anatomy and stress tolerance. *Functional Plant Biology* 28(10): 999-1004.
- Mandhania, S; Madan, S y Sawhney, V. 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 50(2): 227-231.
- MAGRAMA. 2012. *Ministerio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*. [En línea] [Último acceso: 2 1 2012].www.magrama.gob.es
- Martín-Closas, L. 2007. El papel de los jasmonatos en el desarrollo in vitro e in vivo de la planta de patata *Solanum tuberosum* ssp. L. *Tesis Doctoral. Universidad de Lleida. Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería*, 145p.
- Martínez, M. 1996. La patata de siembra en España: desarrollo productivo y comercial de un cultivo normalizado y controlado. *Ería* 39-40: 109-123.
- Mattioli, R; Marchese, D; D'Angeli, S; Altamura, M y Trovato, M. 2008. Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 66, 277-288
- Meloni, D. A; Oliva, M. A; Ruiz, H. A y Martínez, C. A. 2001. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 24: 599-612.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, Antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mishra, S y Dubey, R. S. 2006 Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology*. 163, 927-936
- Moftah, A y Michel, B. 1987. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiology* 83: 283-286.

- Molinier, J; Ries, G; Zipfel, C y Hohn, B. 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442(7106): 1046-1049.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25(2): 239-250.
- Munns, R; Schachtman, D y Condon, A. 1995. The significance of a two phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology* 22(4): 561-569.
- Munns, R y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Nader, C; D'Amico, M; Khavari-Nejad, R; Izzo, R y Navari-Izzo, F. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(9):695-701.
- Neill, S. J; Desikan, R y Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion on Plant Biology* 5: 388-395.
- Nilsen, E y Orcutt, D. 1996. *Physiology of plants under stress*. En: *Abiotic Factors*. New York: John Wiley & Sons. 704p.
- Orozco-Cardenas, M. L; Narvaez-Vasquez, J y Ryan, C. A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding systemin and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13: 179-191.
- Ovchinnikova, A; Krylova, E; Gavrilenko, T; Smekalova, T; Zhuk, M y Knaoo, S. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes *Solanum* section Petota: (*Solanaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 165: 107-155.
- Parida, A y Das, A. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(3): 324-349.
- Pastor, F. 1983. Variedades de patata de siembra certificadas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid-España. Hoja divulgativa 16/83, 24p.
- Pelacho, A. M y Mingo-Castel, A. M. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured in vitro. *Plant Physiology* 97: 1253-1255.
- Perrone, S. T; McDonald, K. L; Sutherland, M. W y Guest, D. I. 2003. Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp.. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 62: 127-1235.

- Petrusa, L y Winicov, I. 1997. Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiological Biochemistry*. 35: 303-310.
- Piqueras, A; Han, B; Van Huylbroeck, J y Debergh, P. 1998. Effect of different environmental conditions in vitro on sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Growth Regulation* 25(1): 5-10.
- Pumisacho, M y Sherwood, S. 2002. *El cultivo de la papa en Ecuador*. Quito: INIAP-CIP. 230p.
- Qi, T; Song, S; Ren, Q; Wu, D; Huang, H; Chen, Y; Fan, M; Peng, W; Ren, C y Xie, D. 2011. The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 1795-1814.
- Rai, M, K; Kalia, R. K; Singh, R; Gangola, M. P y Dnawan, A.K. 2011. Developing stress tolerant plants through in vitro selection. An overview. *Environmental Experimental Botany* 71: 89-98.
- Rajendran, K; Tester, M y Roy, S. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell and Environment* 32(3): 237-249.
- Ramakrishna, A y Ravishankar, A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signalling and Behavior* 6(11): 1720-1731.
- Ranalli, P; Ruaro, B G; Delre, P; Dicadilo, M y Mandolino, G. 1994. Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Research* 37: 383-391.
- Rodríguez-Falcon, M; Bou, J. y Prat, S. 2006. Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with flowering response. *Annual Review of Plant Biology* 57: 151-180.
- Roman Cortez, M. y Hurtado, G. 2002. *Guía técnica Cultivo de La Papa*. 1 ed. San Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. 36p.
- Sarkar, D. 2010. Photoperiodic inhibition of potato tuberization: An update. *Plant Growth Regulation* 62(2): 117-125.
- Shaterian, J; Waterer, D; De Jong, H y Tanino, K. K. 2005. Differential stress responses to NaCl salt application in early-and late maturing diploid potato (*Solanum* sp.) clones. *Environmental Experimental Botany* 54: 202-212.

- Stepien, P y Klobus, G. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiologia Plantarum* 125(1): 31-40.
- Stoddard, F; Balko, C; Erskine, W; Khan, H; Link, W y Sarker, A. 2006. Screening techniques and sources of resistance to abiotic stresses in cool-season food legumes. *Euphytica* 147(1/2):167-186.
- Szabados, L y Savoure, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.
- Taiz, L y Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. Fifth ed. U.S.A: Sinauer Associates.782p.
- Toro, F. J. 2003. Efecto de los jasmonatos en el desarrollo in vitro e in vivo de especies hortícolas. *Tesis doctoral. Universitat de Lleida. Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería*.141p.
- Tsonev, T. D; Lazova, G. N; Stoinova, Z. G y Popova, L. P. 1998. A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 17:153-159.
- Turkan, I; Demiral, T y Sekmen, A. 2013. The regulation of antioxidant enzymes in two Plantago species differing in salinity tolerance under combination of waterlogging and salinity. *Functional Plant Biology* 40: 484-493.
- Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology* 428: 419-438.
- Van Dam, J; Kooman, P. L y Struik, P. C. 1996. Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (K L.). *Potato Research* 39: 51-62.
- Vlot, A. C; Dempsey, D. M y Klessig, D. F. 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Wang, S. Y. 1999. Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. *Journal Plant Growth Regulation* 18: 127-134.
- Wasilewska, A; Vlad, F; Sirichandra, C; Redko, Y; Jammes, F; Valon, C; Frey, N. F y Leung, J. 2008. Update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant* 1: 198-217.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annual Botany (London)* 100: 681-697.

Wittstock, U. y Gershenzon, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5(4): 300-307.

Xiang, C y Oliver, D. J. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metal and jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1539-1550.

Yamaya, T y Matsumoto, H. 1989. Accumulation of asparagines in NaCl-stressed barley seedlings. *Berichte des Ohara Institut fur Landwirtschaftliche Biologie, Okayama Universitat* 19 181-188.

Yazici, I; Turkan, I; Sekmen, A. y Demiral, T. 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 61(1): 49-57.

Yoon, J; Hamayun, M; Lee, S y Lee, I. 2009. Methyl jasmonate alleviating salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science Biotechnology* 12(2): 63-68.

Zhu, J. K. 2007. *Plant salt stress*. New York: John Wiley & Sons, Ltd.1-3p.

2.- OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

- Evaluar el efecto protector del metil jasmonato frente al estrés salino en cuatro cultivares de patata mediante un sistema de cultivo *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Caracterizar *in vitro* cuatro cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac de diferente ciclo de maduración en base a parámetros fisiológicos de desarrollo vegetativo y radical.
- Evaluar *in vitro* el efecto del metil jasmonato, aplicado al medio de cultivo, sobre el desarrollo vegetativo y radical de cuatro cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac de diferente ciclo de maduración.
- Evaluar *in vitro* el efecto del estrés salino en cuatro cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac de diferente ciclo de maduración, en base a caracteres fisiológicos de desarrollo vegetativo y radical.
- Determinar *in vitro* el posible efecto protector del metil jasmonato frente al estrés salino en cuatro cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac de diferente ciclo de maduración.
- Cuantificar el contenido de prolina como parámetro para determinar la tolerancia o susceptibilidad de los cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac a la salinidad y el posible efecto protector del MeJa frente al estrés salino.
- Determinar la actividad antioxidante de la CAT y la POD en el cultivar de patata Kennebec expuesto al estrés salino y el posible efecto protector del metil jasmonato ante el estrés oxidativo.

3. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN

3.- CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN

3.1. INTRODUCCIÓN

La patata *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, es un tubérculo originario de América del Sur, llegó a Europa en 1534 tras la conquista española y desde entonces se ha distribuido por Europa y por el resto del mundo. La patata actualmente ocupa el cuarto lugar en importancia como alimento para la población humana después del maíz, trigo y arroz (FAO, 2014). La producción mundial del tubérculo presenta un crecimiento progresivo, llegando a alcanzar las 325 millones de toneladas en el año 2010.

La producción de tubérculos de siembra y la producción de tubérculos para consumo e industria en la región mediterránea está limitada en gran parte por las condiciones climáticas y edáficas (Frusciante et al., 1999). En la región mediterránea la producción de patata para consumo se encuentra mayoritariamente en España e Italia (FAO, 2014), países donde se siembran principalmente cultivares provenientes de Holanda y Reino Unido, sin embargo los rendimientos en la región mediterránea son significativamente menores a los registrados en los países de origen de los cultivares (Frusciante et al., 1999; Hijimans et al., 2003).

La diferencia en rendimiento del cultivo de patata presente en la región mediterránea con Holanda o Reino Unido, se debe en gran parte a las condiciones climáticas (temperatura y pluviometría) y de suelos (áridos y propensos a la desertificación) propios de la región. La temperatura, pluviometría y suelo condicionan la época de siembra, el desarrollo y el ciclo de maduración de los cultivares (Frusciante et al., 1999; Hijimans et al., 2003). Por esta razón, para incrementar la producción de patata en la región mediterránea es necesaria la búsqueda de cultivares que muestren una mejor adaptación a las condiciones climáticas y de suelo mediterráneas. Algunas de las características deseadas en los cultivares de patata para la región mediterránea están relacionadas con un mayor rendimiento, calidad, resistencia a plagas, enfermedades y mayor tolerancia a factores abióticos como la sequía, heladas y salinidad (Bradshaw et al., 2006).

La evaluación tradicional en campo y los métodos de selección utilizados para identificar nuevos cultivares de patata son laboriosos y consumen mucho tiempo, requiriendo ensayos durante varios años y en diferentes localidades. Es necesario también tener en cuenta que la duración del ciclo de maduración de los cultivares puede aumentar o disminuir en función de las condiciones de la temperatura, de la humedad del aire y suelo y también de la radiación, lo cual dificulta la selección de los cultivares entre localidades (Donnelly et al., 2003). Por lo tanto, un cultivar de patata cultivado con las condiciones climáticas de una localidad, en la cual presente un ciclo de maduración semi tardío, si se cultiva con condiciones climáticas con mayor temperatura y radiación, posiblemente la duración del ciclo de maduración se acorte y su comportamiento sea como un semi temprano.

La selección de cultivares en campo ha demostrado ser ineficiente, particularmente en las primeras generaciones, donde el error del muestreo es alto debido a la variabilidad de la población en parcelas pequeñas (Gopal et al., 1992). En este sentido, la propagación *in vitro* de patata a través de secciones nodales ha sido utilizada como un método rápido para multiplicar cultivares para la producción de tubérculos de siembra y también para la conservación del germoplasma (Dodds et al., 1991; Ranalli et al., 1994; Donnelly et al., 2003; Gopal e Iwama, 2007).

El cultivo *in vitro* ha permitido caracterizar genéticamente los cultivares de diferentes especies como maíz (Miki et al., 2001) y arroz (Zacchini et al., 1997). El cultivo *in vitro* de secciones nodales de patata ha permitido también seleccionar cultivares con características agronómicas deseadas, y mantener y conservar el germoplasma (Dodds et al., 1991; Ranalli et al., 1994; Tadesse et al., 2000). Esta técnica también permite analizar una gran cantidad de germoplasma en corto tiempo y en un espacio reducido, independientemente de la estación de cultivo. La selección para varios caracteres de importancia económica, como la producción de tubérculos, la tolerancia a factores bióticos y abióticos o la obtención de plantas libres de enfermedades y virus bajo condiciones controladas puede ayudar a solucionar los problemas de variación en el medio ambiente durante los años y lugares de los ensayos de campo.

No obstante, para el caso de patata no se han encontrado suficientes estudios de caracterización *in vitro* de cultivares en base al desarrollo vegetativo y radical, características fisiológicas que son dependientes de factores genéticos, bióticos, abióticos y ciclo de maduración de los cultivares (Gopal y Minocha, 1998; Ruiz de Galarreta et al., 2006).

El objetivo del presente ensayo fue caracterizar *in vitro* cuatro cultivares de patata de diferente ciclo de maduración en base a parámetros fisiológicos de desarrollo vegetativo y radical.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este experimento, se seleccionaron cuatro cultivares de patata *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac. Estos cultivares fueron suministrados como tubérculos de siembra clase “A” certificados, de calibre 30/55mm., por OPPOSA en la zona del Pirineo Navarro (España), proviniendo de lotes que fueron precintados en octubre de 2004. Las características de los cultivares de patata utilizados en esta investigación se detallan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Principales características de los tubérculos de los cultivares de patata evaluados.

<i>Característica</i>	<i>Cultivares</i>			
	<i>Agata</i>	<i>Monalisa</i>	<i>Kennebec</i>	<i>Red Pontiac</i>
Maduración	Extra-temprana	Semi-temprana	Semi tardía	Tardía
Dormancia	Larga	Larga	Media	--
Desarrollo follaje	Bueno	Bueno	Muy Bueno	Bueno
Color de piel	Amarillo claro	Amarillo claro	Amarillo claro	Rojo oscuro
Color de carne	Amarillo claro	Amarillo claro	Blanco	Blanco
Forma del tubérculo	Oval	Oval alargado	Oval redondeado	Oval
Profundidad de ojos	Superficiales	Superficiales	Semi superficiales	Semi-profundos
Tamaño tubérculos	Muy grandes	Grandes	Muy grandes	Grandes
Rendimiento	Medio - alto	Medio - alto	Alto	Alto
Contenido materia seca	Muy bajo	Bajo	Muy bajo	Bajo
Utilización	Fresco	Fresco	Freír/Fresco	Fresco
Origen	Holanda	Holanda	USA	USA

Fuente: Europotato, 2014.



Figura 6. Aspecto de los tubérculos de los cultivares de patatas cultivadas en España y objeto de estudio de este trabajo.

Los cultivares de patata citados se seleccionaron por ser patatas de consumo en fresco con ciclos de maduración diferentes, bajo condiciones de Navarra, y porque su cultivo se encuentra ampliamente distribuido en España. En la Comunidad Autónoma de Navarra, sitio de origen de los tubérculos semilla utilizados para esta investigación, el cultivar Agata posee un ciclo de maduración extra temprano, menor a 90 días. El cultivar Monalisa posee un ciclo de maduración semi temprano y la duración del cultivo se encuentra entre 90 y 120 días. El cultivar Kennebec posee un ciclo de maduración semi tardío; la duración del cultivo se encuentra entre 120 y 150 días. El cultivar Red Pontiac posee un ciclo de maduración tardío y la duración del cultivo es mayor a 150 días (Appacale, 2008).

Los tubérculos certificados de los cuatro cultivares se cultivaron en bandejas de plástico, utilizando como sustrato vermiculita autoclavada y colocándolos en oscuridad durante 30 días con la humedad necesaria para facilitar su brotación y así poder obtener secciones uninodales de 0,8 a 1cm de longitud. Las secciones nodales obtenidas se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio en agua al 2% y con 6-8 gotas de Tween 20 por litro durante 10 minutos; para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio se enjuagó 4 veces con agua destilada estéril. A continuación, cada sección nodal se cultivó en tubos de cultivo con 20ml de medio de propagación: MS con 2% sacarosa, pH ajustado a 5,7-5,8 (Murashige y Skoog, 1962), autoclavado previamente a 121°C durante 15 minutos. Las secciones nodales se incubaron durante 4 semanas en una cámara de cultivo a 20±1°C, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Como fuente de luz se utilizaron fluorescentes Gro-lux con una intensidad a nivel de explantos de 55µmol.m⁻².s⁻¹. A partir de aquí se realizaron subcultivos consecutivos para incrementar la cantidad de material vegetal disponible. Finalmente se cultivaron 20 secciones nodales de cada cultivar utilizando el medio MS con 3% sacarosa, pH ajustado a 5,7-5,8. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado en una gradilla plástica.

La caracterización *in vitro* de cada cultivar respecto al ciclo de maduración se realizó evaluando las características fisiológicas del desarrollo vegetativo y radical de los 20 explantos, registrando las siguientes variables al final de las cuatro semanas de cultivo: La longitud de explanto (LE) y del sistema radical (LSR) se registraron utilizando una regla milimétrica. La cantidad de raíces (CR) se determinó de forma visual en base a

una escala establecida de 0 a 4 de acuerdo al número de raíces, 0 = ninguna, 1= 1-3 raíces, 2= 4-6 raíces, 3= 7-10 raíces y 4= más de 10 raíces. El peso fresco (PFE) y seco de los explantos (PSE), incluye raíz - tallo - hojas, el peso seco de hojas (PSH) y de raíces (PSR) se registró utilizando una balanza de precisión de 1 ± 0.1 mg. El área foliar (AF) de los explantos se determinó utilizando el medidor de área foliar (mm^2) AM-100 (ADC).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA para cada parámetro evaluado en cada uno de los cuatro cultivares. En su caso la separación de medias se obtuvo empleando el test de Tukey ($p < 0,05$) del paquete estadístico SAS versión 9.

3.3. RESULTADOS

Los parámetros de desarrollo vegetativo y radical analizados presentaron diferencias significativas entre los cuatro cultivares, lo cual indica que un mayor o menor desarrollo vegetativo y del sistema radical puede depender de las características fenotípicas y genotípicas de cada cultivar y de su ciclo de maduración (Tabla 4).

Se observa de forma general que el cultivar Agata presentó un desarrollo vegetativo y radical significativamente superior, o igual en algunos casos, al observado en los cultivares Monalisa y Kennebec. Mientras, el desarrollo vegetativo y radical del cultivar tardío Red Pontiac presentó los valores más bajos para los parámetros de desarrollo evaluados durante este experimento (Tabla 4, Figura 7).

Tabla 4. Características de desarrollo vegetativo y radical de los explantos de cada cultivar de patata después de 4 semanas de cultivo.

LE: longitud explanto (parte aérea), PFE: peso fresco explanto, AF: área foliar, PSH: peso seco hojas, LSR: longitud sistema radical, CR: cantidad de raíces, PSR: peso seco raíces, PSE: peso seco de explanto.

<i>Cultivar</i>	<i>LE</i> (<i>cm</i>)	<i>AF</i> (<i>mm</i> ²)	<i>LSR</i> (<i>cm</i>)	<i>CR</i> (0-4)**	<i>PSH</i> (<i>mg</i>)	<i>PSR</i> (<i>mg</i>)	<i>PFE</i> (<i>mg</i>)**	<i>PSE</i> (<i>mg</i>)**
Agata	11,11 ^a	364,50 ^a	10,40 ^a	1,95 ^a	5,30 ^a	5,42 ^a	254,46 ^a	18,04 ^a
Monalisa	7,84 ^b	120,20 ^b	5,99 ^b	1,00 ^b	2,73 ^b	4,24 ^b	140,45 ^b	11,90 ^b
Kennebec	7,81 ^b	382,67 ^a	5,21 ^c	1,90 ^a	5,41 ^a	3,04 ^c	219,92 ^a	13,95 ^b
Red Pontiac	5,31 ^c	177,20 ^b	3,37 ^d	1,20 ^b	2,64 ^b	1,87 ^d	115,74 ^b	8,18 ^c

*Para cada parámetro letras diferentes entre cultivares indican diferencias significativas entre ellos (p<0,05).

** Peso fresco y seco de explanto incluye raíces, tallos y hojas. La cantidad de raíces (CR) se determinó de forma visual en base a una escala establecida de 0 a 4 de acuerdo al número de raíces, 0 = ninguna, 1= 1-3 raíces, 2= 4-6 raíces, 3= 7-10 raíces y 4= más de 10 raíces.

Los valores de cada variable corresponden al valor promedio de 20 explantos.

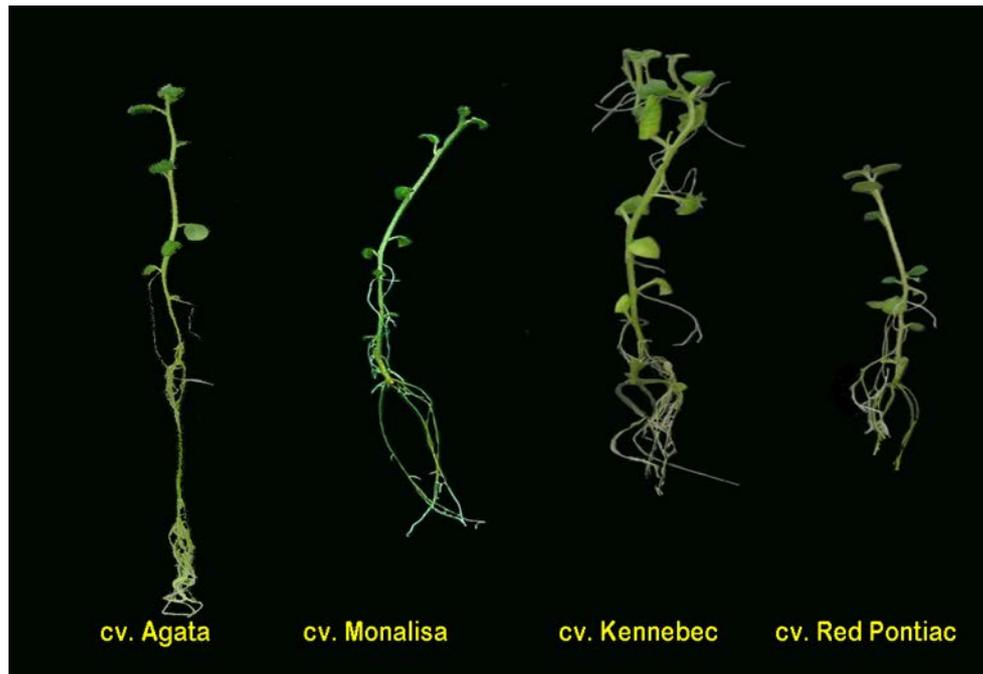


Figura 7. Desarrollo vegetativo y radical de los cuatro cultivares de patata después de cuatro semanas de cultivo *in vitro*.

La mayor longitud, peso fresco y peso seco de los explantos se observó en el cultivar Agata, frente al resto de cultivares que poseen un ciclo de maduración más largo. No obstante, la longitud y el peso seco de los explantos en los cultivares Monalisa y Kennebec fue similar entre sí y superior a la observada en cultivar Red Pontiac (Tabla 4). El aérea foliar de los explantos fue mayor en los cultivares Kennebec y Agata, seguidos por el cultivar Red Pontiac; el cultivar Monalisa presentó la menor área foliar después de las cuatro semanas de cultivo. Así mismo, el peso seco de las hojas de los explantos de los cultivares Kennebec y Agata fue superior al observado en los cultivares Monalisa y Red Pontiac (Tabla 4).

Los explantos del cultivar Agata alcanzaron la mayor longitud del sistema radical y peso seco de raíces seguido por los cultivares Monalisa y Kennebec; la menor longitud del sistema radical y peso seco de raíces se observó en el cultivar Red Pontiac (Tabla 4). La cantidad de raíces fue mayor en el cultivar Agata y Kennebec, mientras que la menor se observó en los cultivares Monalisa y Red Pontiac (Tabla 4).

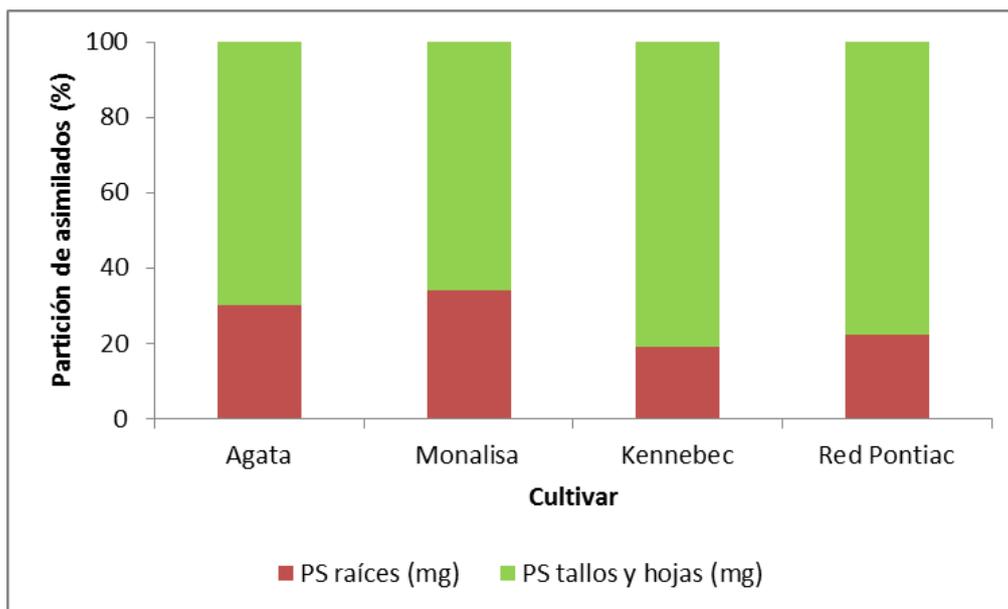


Figura 8. Porcentaje de partición de asimilados hacia la parte aérea y radical en base al peso seco de los explantos.

En todos los cultivares de patata evaluados la partición de asimilados fue mayor hacia la parte aérea. No obstante, en los cultivares Agata y Monalisa el porcentaje de asimilados de la parte aérea fue un 30% menor que el observado en los cultivares Kennebec y Red Pontiac. Así, en los cultivares Agata y Monalisa el porcentaje de asimilados en la parte radical fue mayor que en los cultivares Kennebec y Red Pontiac (Figura 8).

3.4.-DISCUSIÓN

Tradicionalmente la selección de las características agronómicas deseables de cultivares de patata se ha realizado en campo. Esta metodología conlleva mucho tiempo y esfuerzo y aún más si se persigue extraer las raíces del suelo, lavarlas y analizar su cantidad y longitud (Iwama y Yamaguchi, 2006). De acuerdo con varios autores, los resultados obtenidos en este experimento demuestran la eficiencia de la técnica de cultivo *in vitro* para obtener en un espacio y tiempo corto el suficiente número de explantos para la selección y caracterización de cultivares de patata en base a sus características vegetativas y del sistema radical (Gopal y Minocha, 1998; Iwama y Yamaguchi, 2006; Pérez-Clemente et al., 2006).

En este experimento, el cultivar Agata presentó un mayor desarrollo de las variables evaluadas respecto al resto de cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac. En el cultivar Monalisa todas las variables mostraron una disminución significativa frente al cultivar Agata. Mientras que, en el cultivar Kennebec, el desarrollo de los explantos fue superior al de los cultivares Monalisa y Red Pontiac en diversos aspectos; incluso variables como el peso fresco de explanto, el área foliar y la cantidad de raíces presentaron valores estadísticamente equivalentes a los observados en el cultivar Agata. Los explantos del cultivar Red Pontiac fueron los que menor desarrollo vegetativo y radical alcanzaron.

De acuerdo con Gopal e Iwama (2007) estos resultados sugieren que el desarrollo vegetativo y radical, expresado en base al peso seco de los explantos, depende de las características genotípicas de cada cultivar y de las condiciones de temperatura, fotoperiodo y humedad utilizadas para la caracterización de los cultivares y que condicionan la duración del ciclo de maduración. Así, el cultivar Agata presentó un mayor desarrollo vegetativo y radical que los cultivares más tardíos Monalisa, Kennebec y Red Pontiac. Por ello, bajo las condiciones utilizadas en esta investigación el cultivar Agata, queda claramente clasificado dentro de los cultivares de ciclo de maduración extra temprano.

El cultivar Monalisa clasificado con un ciclo de maduración semi temprano (Appacale, 2008), presentó un desarrollo vegetativo y radical menor frente a los cultivares Agata y Kennebec. A pesar de no observarse diferencias significativas entre el peso seco de los explantos de los cultivares Monalisa y Kennebec, el peso seco de los explantos del cultivar Monalisa se redujo en aproximadamente un 15 por ciento respecto a Kennebec. Por esta razón se considera que bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este ensayo el cultivar Monalisa posee un ciclo de maduración semi tardío.

De forma contraria, el cultivar Kennebec, clasificado como semi tardío (Appacale, 2008), presentó un desarrollo vegetativo y radical superior al cultivar Monalisa y Red Pontiac. Bajo las condiciones de cultivo de este ensayo, el peso seco de explanto en el cultivar Kennebec fue un 30 y 70 por ciento superior que el observado en Monalisa y Red Pontiac, respectivamente. En base a estos resultados se clasifica al cultivar Kennebec con un ciclo de maduración semi temprano. No obstante, estudios previos demostraron que el cultivar Kennebec presenta un mayor desarrollo, mayor producción de tubérculos y mayor adaptación a condiciones adversas frente a los cultivares Agria y Santé (Hassanpanah, 2010). Los explantos del cultivar semi tardío Red Pontiac (Appacale, 2008) presentaron el menor desarrollo de los cultivares evaluados, demostrando así que, bajo las condiciones de temperatura, fotoperiodo y humedad utilizadas, el cultivar Red Pontiac presenta un ciclo de maduración tardío. Los resultados obtenidos en este ensayo concuerdan con lo observado por Shaterian et al. (2005), demostrando que los cultivares tempranos de patata presentan una mayor tasa de crecimiento y biomasa que los cultivares tardíos de patata.

Las diferencias encontradas *in vitro* en el desarrollo vegetativo y radical de los cuatro cultivares, bajo las condiciones de temperatura, fotoperiodo y humedad utilizadas confirman el uso potencial de la técnica de cultivo *in vitro* para la caracterización e identificación de variables agronómicas deseadas en cultivares de patata, siempre y cuando los explantos se cultiven en condiciones de temperatura y fotoperiodo similares a las de la época de cultivo en campo o de una localidad concreta.

Estos resultados concuerdan con investigaciones sobre la selección y caracterización *in vitro* de cultivares de varias especies, dentro de las cuales se incluye la patata y que han demostrado estar correlacionadas con los datos obtenidos a nivel de campo (Iwama, 1998; Gopal y Minocha, 1998; Pérez-Clemente et al., 2006). No obstante, existe poca información sobre la caracterización de cultivares de patata *in vitro* y son necesarios más estudios para identificar cultivares o clones con potencial agronómico de acuerdo a la época de siembra y específicas de cada localidad, tratando que sean lo más similares a las de campo para cada uno de los cultivares a caracterizar.

Por otra parte, el porcentaje de partición de los asimilados en los cultivares Agata y Monalisa fue aproximadamente en un 70% hacia la parte aérea y un 30% hacia las raíces, mientras que, en los cultivares Kennebec y Red Pontiac la repartición fue aproximadamente del 80% hacia la parte aérea y un 20% hacia el sistema radical. Esto sugiere que la proporción de distribución de los asimilados entre la parte aérea y radical pueda ser también una característica propia de cada cultivar.

3.5. CONCLUSIONES

- Se han caracterizado los cuatro cultivares de patata con diferente ciclo de maduración en base al desarrollo vegetativo y radical de los explantos *in vitro*.
- El cultivar Agata fue el que mayor desarrollo vegetativo y radical alcanzó durante las cuatro semanas de cultivo y se clasificó con un ciclo de maduración extra temprano.
- En el cultivar Agata la partición de asimilados fue del 70% para la parte aérea y de 30% hacia las raíces.
- El cultivar Monalisa presentó un desarrollo vegetativo y radical menor al observado en el cultivar Kennebec y se clasificó con un ciclo de maduración semi tardío.
- En el cultivar Monalisa la partición de asimilados fue del 65% hacia la parte aérea y de 35% hacia las raíces.
- El cultivar Kennebec presentó un desarrollo vegetativo y radical inferior al observado en el cultivar extra temprano Agata y se clasificó con un ciclo de maduración semi temprano.
- En el cultivar Kennebec la partición de asimilados fue del 80% hacia la parte aérea y de 20% hacia las raíces.
- El cultivar Red Pontiac fue el que menor desarrollo vegetativo y radical alcanzó durante las cuatro semanas de cultivo y se clasificó con un ciclo de maduración tardío.
- En el cultivar Red Pontiac la partición de asimilados fue del 78% hacia la parte aérea y de 22% hacia las raíces.

3.6. REFERENCIAS

Appacale, 2008. *Consulta cultivares patata de España* [Consulta correo electrónico] 2008.

Bradshaw, J. E; Bryan, G. J y Ramsay, G. 2006. Genetic resources (Including Wild and cultivated *Solanum* Species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Research* 49: 49-65.

Dodds, J. H; Huaman, Z y VanderZaag, P. 1991. Potato germoplasm conservation. En: J. Dodds, ed. *In vitro methods for conservation of plant genetic resources*. London: Chapman & Hall, 93-109p.

Donnelly, D; Coleman, W y Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research* 80: 103-115.

EUROPOTATO, 2014. The European Cultivated Potato Database. www.europotato.com [Último acceso: 2 01 2014].

FAO, 2014. *FAOSTAT. Estadísticas de cultivos por países*. [En línea] www.faostat.org [Último acceso: 2 01 2014].

Frusciante, L; Barone, A; Carputo, D y Ranalli, P. 1999. Breeding and physiological aspects of potato cultivation in Mediterranean region. *Potato Research* 42: 265-277.

Gopal , J; Gaur y Rana, M. S. 1992. Early generation selection for agronomic characters in a potato breeding programme. *Theory and Applied Genetics* 84: 709-713.

Gopal, J e Iwama, K. 2007. In vitro screening of potato against water-stress mediated throught sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports* 26: 693-700.

Gopal, J y Minocha, J. L. 1998. Effectiveness of in vitro selection for agronomic characters in potato. *Euphytica* 103: 67-74.

Hassanpanah, D. 2010. Evaluation of potato cultivars for resistance against water deficit stress under in vivo conditions. *Potato Research* 53: 383-392.

Hijimans, R. J; Condori, B y Carrillo, R. 2003. The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potato Research* 80: 217-219.

Iwama, K. 1998. Development of nodal and lateral roots in potato under field conditions. *Journal Fac-Agri. Hokkaido. University* 68: 33-44.

Iwama, K y Yamaguchi, L. 2006. Abiotic stresses I. En: J. Gopal, edits. *Handbook of potato production, improvement and postharvest management*. New York: Food Products, 231-278p.

Miki, Y; Hshiba, M y Hisajima, S. 2001. Establishment of salt stress rice plants through step up NaCl treatment *in vitro*. *Biologia Plantarum* 3: 391-395.

Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.

Perez, Clemente, P; Montoliu, R. M; López, Clemente, M; Arbona, V y Gómez-Cadenas, A. 2006. *In vitro* tissue culture approaches for the study of salt stress in citrus. *International Conference of Biosaline Agriculture*. Birkhäuser Basel, 32-47p.

Ranalli, P; Ruaro, B G; Delre, P; Dicadilo, M y Mandolino, G. 1994. Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Research* 37: 383-391.

Ruiz de Galarreta, J. I; Pascualena, J; Legorburu, F. J y Ritter, E. 2006. The History of potato (*Solanum tuberosum* L.) Research in Spain. *Potato Research* 49: 19-25.

Shaterian, J; Waterer, D; De Jong, H. y Tanino, K. K. 2005. Differential stress responses to NaCl salt application in early - and latematuring diploid potato (*Solanum* sp.) clones. *Environmental Experimental Botany* 54: 202-212.

Tadesse, M; Lommen, W. J y Struik, P. C. 2000. Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatisation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 59-67.

Zacchini, M; Marotta, A. y Agazio, M. 1997. Tolerance to salt in maize callus lines with different polyamine content. *Plant Cell Reports* 17:119-122.

**4. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DEL METIL
JASMONATO SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES
DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN**

4. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DEL METIL JASMONATO SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN

4.1. INTRODUCCIÓN

Las hormonas vegetales son factores clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas y de uso en la agricultura actual (Wasternack y Hause, 2002). Las hormonas vegetales o los reguladores de crecimiento vegetal, también denominados fitorreguladores, son moléculas orgánicas que se producen de forma natural en las plantas y participan en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las mismas (Hopkins y Hüner, 2008). Las hormonas vegetales se sintetizan en un lugar de la planta y tienen la capacidad de trasladarse a otra parte donde tiene lugar su acción. En algunas ocasiones se producen y actúan como respuesta fisiológica a una situación de estrés, permitiendo disminuir el impacto negativo de dicho estrés.

El ácido jasmónico (JA) y su éster metil jasmonato (MeJa) son derivados del ácido linolénico (LA), son compuestos que contienen un ciclo pentano y que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Creelman y Mullet, 1997). El MeJa fue el primer compuesto identificado como componente principal de aceites esenciales de varias especies de plantas y principalmente del jazmín, *Jasminum grandiflorum* L., (Demole, et al., 1962). En base a experimentos posteriores, el ácido jasmónico (JA) y el metil jasmonato (MeJa), denominados de forma general jasmonatos, fueron considerados inicialmente como inhibidores del crecimiento vegetal, incluyendo entre sus efectos la inhibición de la germinación de semillas de algunas angiospermas, como el amaranto, *Amaranthus caudatus*, (Kepczynski y Bialecka, 1994; Bialecka y Kepczynski, 2003), el cardo, *Silybum marianum*, (Nojavan-Asghari e Ishizava, 1998), el girasol, *Helianthus annuus*, (Corbineau et al., 1988), en tabaco, *Nicotina tabacum*, (Preston et al., 2002), o el maíz, *Zea mays*, (Norastehnia et al., 2007). También se han relacionado con la inhibición del crecimiento del tallo y raíces (Dathe et al., 1981; Staswick et al., 1992; Norastehnia et al., 2007), la inducción de la senescencia en hojas (Yeh et al., 1995; Ananieva et al., 2004), la inhibición de la formación de clorofila (Saniewski y Czapski, 1983; Toro, 2003), la reducción de la tasa fotosintética (Rossato et al., 2002) y la inhibición de la actividad respiratoria (Popova et al., 1988).

Sin embargo, a partir de la década de los 80 se encontraron otros efectos que pueden resultar de uso práctico para la agricultura, como por ejemplo la promoción del almacenamiento de proteínas en tejidos vegetales (Berger et al., 1995; Bunker et al., 1995; Feussner et al., 1995; Grimes et al., 1992), la inducción de la tuberización en patata (Yoshihara et al., 1989; Pelacho y Mingo-Castel, 1991; Ravnikar et al., 1992), el aumento de la longitud de tallo y de raíces en melón (Toro, 2003), la inducción de la formación de tricomas en tomate (Li et al., 2004), la viabilidad del polen y el desarrollo de anteras (McConn y Browse, 1996; Li et al., 2004), o la maduración de frutos y la síntesis de pigmentos (Czapski y Saniewski, 1992). Por otra parte también se ha determinado que actúan como señal de defensa para activar los mecanismos de resistencia a plagas, enfermedades, daños causados por la radiación ultravioleta, heridas y factores de estrés abiótico, como la sequía, la salinidad o las altas temperaturas (Howe et al., 1996; McConn et al., 1996; Vijayan et al., 1998; Rao, et al., 2000; Reymond et al., 2000; Farmer, 2001; Nibbe et al., 2002; Xiao et al., 2004; Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2007; Kim et al., 2009).

El objetivo de este experimento fue evaluar *in vitro* el efecto del metil jasmonato, aplicado al medio de cultivo, sobre el desarrollo vegetativo y radical de los cuatro cultivares de patata de diferente ciclo de maduración, anteriormente utilizados.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este ensayo se utilizó la metodología descrita en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, variando únicamente en la adición de las concentraciones de MeJa. Para cada uno de los cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac se utilizó un total de 20 secciones nodales. Las secciones nodales se cultivaron en el medio MS con 3% sacarosa, pH ajustado a 5,7-5,8 y con la adición de 5 concentraciones de MeJa 0, 10, 50, 250 y 1250nM al medio de cultivo. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado en una gradilla plástica.

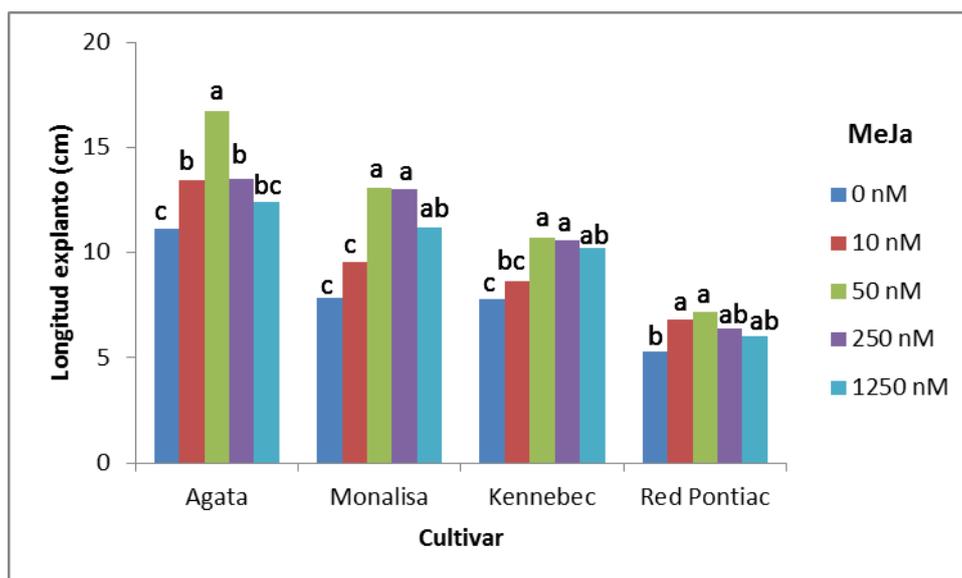
Para evaluar el efecto de las concentraciones de MeJa sobre el desarrollo de los explantos de los cuatro cultivares se determinó, a las cuatro semanas de cultivo, el desarrollo vegetativo y radical de los 20 explantos. Trascurridas las cuatro semanas de cultivo se registraron las siguientes variables: longitud del explanto, longitud del sistema radical, cantidad de raíces, peso fresco y seco de los explantos, peso seco de hojas y raíces y área foliar.

La longitud de explanto (LE) y del sistema radical (LSR) se registraron utilizando una regla milimétrica. La cantidad de raíces (CR) se determinó de forma visual en base a una escala establecida de 0 a 4 de acuerdo al número de raíces, 0 = ninguna, 1= 1-3 raíces, 2= 4-6 raíces, 3= 7-10 raíces y 4= más de 10 raíces. El peso fresco (PFE) y seco de los explantos (PSE) (incluye raíz - tallo - hojas), el peso seco de hojas (PSH) y raíces (PSR) se registró utilizando una balanza de precisión de 1 ± 0.1 mg. El área foliar (AF) de los explantos se determinó utilizando el medidor de área foliar (mm^2) AM-100 (ADC).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA para cada parámetro evaluado independientemente en cada uno de los cuatro cultivares expuestos a las concentraciones de MeJa. En su caso la separación de medias se obtuvo empleando el test de Tukey ($p < 0,05$) del paquete estadístico SAS versión 9.

4.3. RESULTADOS

El desarrollo vegetativo y radical de los explantos después de cuatro semanas de cultivo presentó diferencias significativas debido a la adición de concentraciones crecientes de MeJa en el medio de cultivo. En conjunto, el efecto de la aplicación exógena de MeJa fue similar en los cuatro cultivares de patata e independiente del ciclo de maduración (Figura 16).

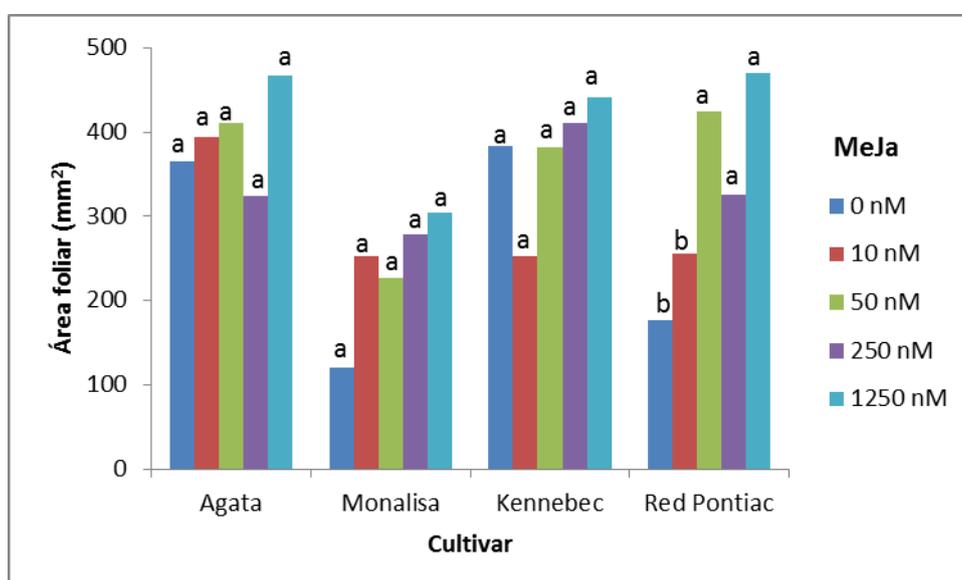


*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 9. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud de explanto en los cuatro cultivares de patata, a las cuatro semanas de cultivo. Los resultados corresponden al promedio 20 explantos de cada cultivar.

La longitud de los explantos aumentó hasta cierto nivel con el incremento de la concentración de MeJa en el medio de cultivo; esta respuesta fue independiente del cultivar y del ciclo de maduración (Figura 9). El efecto se saturó en todos los casos para los tratamientos expuestos a las concentraciones superiores a 50nM de MeJa. El cultivar Agata aumentó significativamente la longitud de los explantos (Figura 9), alcanzando una longitud hasta un 50% superior a la de los explantos control con la concentración de 50nM de MeJa; para el resto de las concentraciones ensayadas el incremento fue de aproximadamente un 18%. En el cultivar Monalisa, el efecto del MeJa sobre la longitud de los explantos fue semejante, llegando a incrementarse alrededor de un 60% con las concentraciones de 50 y 250nM de MeJa, la longitud de los explantos expuestos a la menor dosis de MeJa superó en un 22% al tratamiento sin MeJa, aunque el efecto no pudo demostrarse como significativo (Figura 9).

El efecto del MeJa en el alargamiento del tallo del cultivar Kennebec fue semejante al del cultivar Monalisa aunque cuantitativamente algo menor; los explantos de Kennebec expuestos a concentraciones de 50, 250 y 1250nM de MeJa incrementaron su longitud, alrededor del 30% respecto al tratamiento sin MeJa (Figura 9). La respuesta sobre el alargamiento del tallo en el cultivar tardío Red Pontiac fue la menor de todas y también se produjo a concentraciones menores de MeJa, de 10 y 50nM, que aumentaron la longitud de los explantos alrededor del 30%; la adición de concentraciones superiores de MeJa no promovió significativamente su alargamiento, a pesar de ser aproximadamente un 13% mayor respecto al tratamiento sin MeJa (Figura 9; Figura 16).

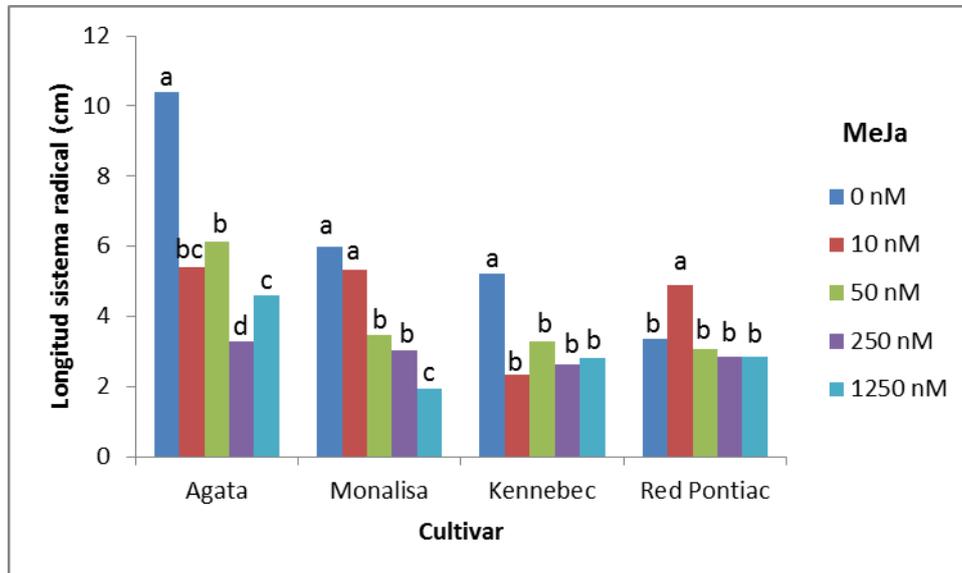


*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 10. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el área foliar del explanto en los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio 20 explantos de cada cultivar.

El área foliar de los explantos de los cultivares Agata, Monalisa y Kennebec sometidos a la aplicación de las concentraciones crecientes de MeJa no presentó diferencias significativas entre sí (Figura 10), sin embargo en todos ellos se observó que de forma general se produjo un aumento del área foliar, en números absolutos, respecto a la de los explantos sin metil jasmonato. La ausencia de diferencias significativas se debe a la alta variabilidad entre los explantos de cada cultivar (Figura 10). El incremento del área foliar sí que fue significativo en el cultivar tardío Red Pontiac tratado con 50, 250 y 1250nM de MeJa. En el resto de tratamientos, a pesar de no identificarse diferencias significativas, se observó la misma tendencia de los otros cultivares, mostrando una mayor área foliar de los explantos. Además se observó que los aumentos de área foliar

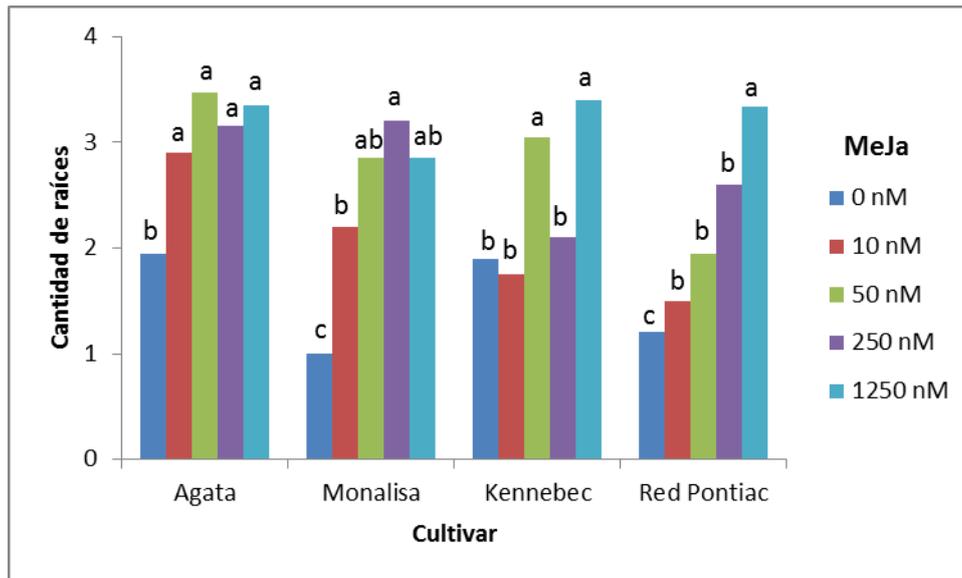
de los cuatro cultivares iban acompañados de síntomas de clorosis en las hojas (Figura 16).



*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 11. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud del sistema radical del explanto en los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio 20 explantos de cada cultivar.

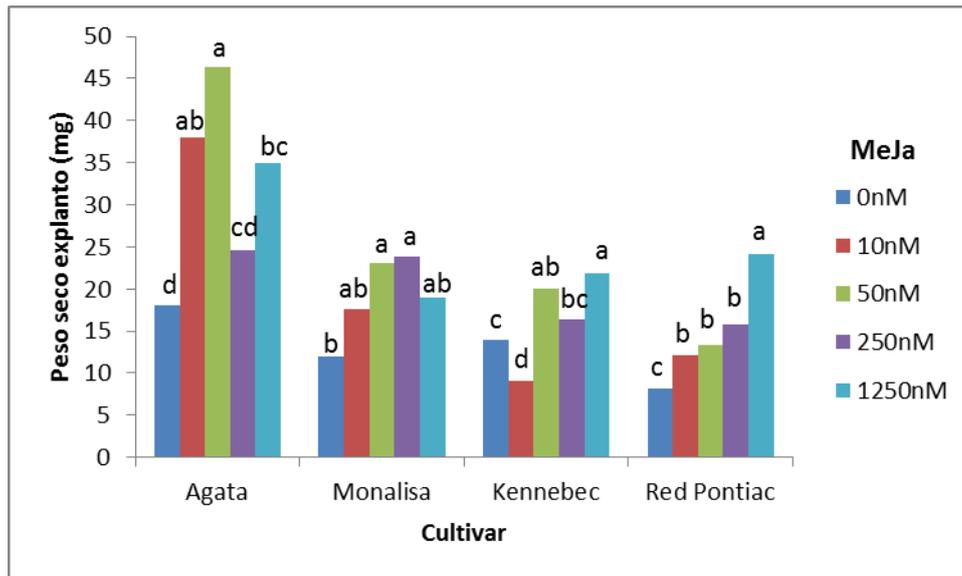
La aplicación de MeJa en el medio de cultivo, en general, en todas las concentraciones disminuyó de forma manifiesta la longitud del sistema radical de los explantos de los cultivares (Figura 11). Los explantos de los cultivares Agata, Monalisa y Kennebec expuestos a concentraciones de 50 e incluso de tan solo 10nM de MeJa mostraron una disminución significativa en la longitud del sistema radical respecto al tratamiento sin MeJa, disminución que se incrementó a concentraciones mayores de MeJa (Figura 11). En el cultivar Red Pontiac el efecto mostró la excepción de que los explantos cultivados en la concentración más baja de MeJa, 10nM, incrementaron la longitud del sistema radical; en este caso concentraciones superiores de MeJa provocaron su disminución pero sin presentar diferencias significativas frente al tratamiento sin MeJa (Figura 11; Figura 16).



*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 12. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la cantidad de raíces (0= ninguna; 1= 1 a 3 raíces; 2=4 a 6 raíces; 3= 7 a 10 raíces) del explanto en los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio 20 explantos de cada cultivar.

En la mayoría de los casos, los explantos de los cuatro cultivares de patata utilizados en este experimento, incrementaron significativamente la cantidad de raíces al ser cultivados con las concentraciones ensayadas de MeJa (Figura 12). En los cultivares Agata y Monalisa todas las concentraciones de MeJa evaluadas provocaron el incremento significativo de la cantidad de raíces (Figura 12). El aumento fue de hasta un 71% en el cultivar Agata y mucho más elevado, hasta un 185%, en el cultivar Monalisa (Figura 12). En el cultivar de Kennebec la cantidad de raíces aumentó irregularmente cuando los explantos fueron cultivados con las concentraciones intermedias y alta de MeJa, con un incremento de hasta el 75% (Figura 12); sin embargo, es importante destacar que los explantos de este cultivar expuestos a la menor concentración de MeJa no presentaron diferencias significativas con las concentraciones de 0 y 250nM de MeJa (Figura 12). En el cultivar Red Pontiac, el MeJa también aumentó la cantidad de raíces de los explantos; el aumento fue de hasta un 177% cuando fueron cultivados con la concentración máxima de MeJa (Figura 12; Figura 16).



*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

** Peso seco de explanto incluye (raíces - tallos - hojas).

Figura 13. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco del explanto en los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio 20 explantos de cada cultivar.

En general, en los cuatro cultivares de patata en estudio, el aporte del MeJa al medio de cultivo incrementó el peso seco de los explantos (Figura 13). En el cultivar Agata, el peso seco de los explantos aumentó hasta un 157% cuando se cultivaron con 50nM de MeJa; las restantes concentraciones de MeJa también aumentaron de forma importante el peso seco de los explantos (Figura 13). Un incremento similar se observó en el cultivar Monalisa; los explantos expuestos a concentraciones de 50 y 250nM de MeJa incrementaron significativamente su peso seco un 93% respecto al tratamiento sin MeJa (Figura 13), mientras que, los explantos cultivados con 10 y 1250nM no presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control, aunque registraron un importante incremento del 60% en el peso seco de los explantos (Figura 13). Por otra parte, los explantos del cultivar Kennebec aumentaron su peso seco alrededor de un 50% con la excepción de los tratados con 10nM de MeJa que lo disminuyeron (Figura 13). En el cultivar Red Pontiac el peso seco de los explantos aumentó significativa y progresivamente con el incremento de las concentraciones de MeJa, hasta ser un 195% superior al de los explantos control cuando se cultivaron en la concentración de 1250nM de MeJa (Figura 13).

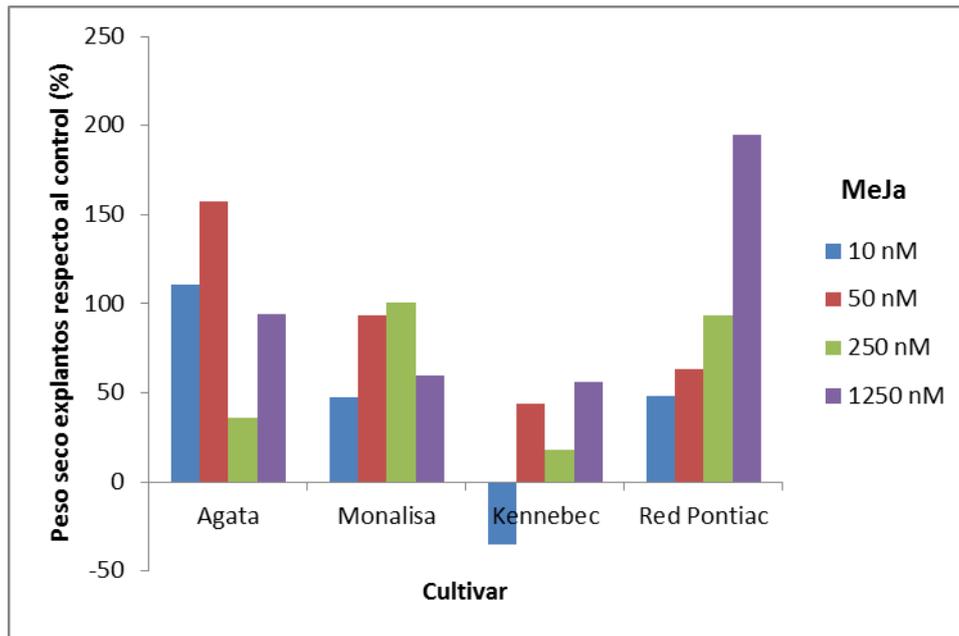


Figura 14. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el porcentaje de peso seco de los explantos respecto al control para cada uno de los cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio 20 explantos de cada cultivar.

Las concentraciones de MeJa incrementaron el peso seco de los explantos de los cultivares Agata, Monalisa y Red Pontiac respecto al tratamiento control de cada cultivar, con la única excepción de la concentración de 10nM de MeJa que en el cultivar Kennebec lo redujo (Figura 14). En el cultivar Agata, el mayor peso seco de los explantos se obtuvo con 50nM de MeJa; (Figura 14). Para el cultivar Monalisa las concentraciones de MeJa de 50 y 250nM permitieron alcanzar el mayor peso seco de los explantos respecto al tratamiento control (Figura 14). Los explantos del cultivar Kennebec que mayor peso seco alcanzaron fueron los cultivados con 50 y 1250nM de MeJa. Mientras que en el cultivar Red Pontiac el aumento del peso seco fue proporcional al incremento de la concentración de MeJa; el mayor peso seco se obtuvo con la concentración de 1250nM de MeJa.

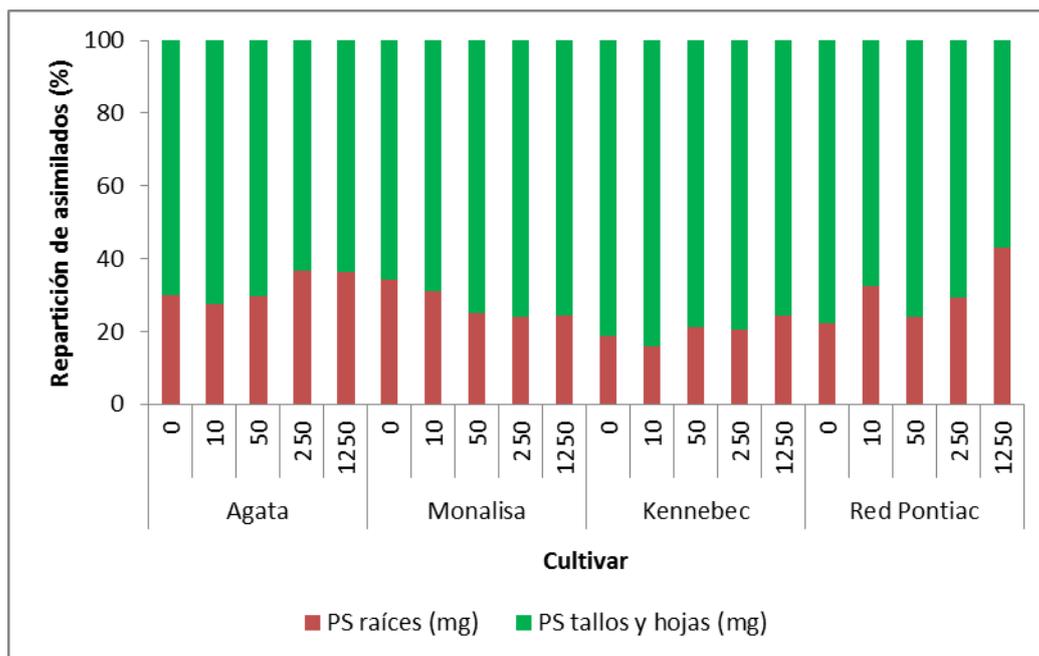


Figura 15. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el porcentaje de partición de asimilados, en base al peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio 20 explantos de cada cultivar.

En el cultivar Agata, el porcentaje de asimilados hacia las raíces aumentó alrededor de un 26% respecto al tratamiento control cuando los explantos se cultivaron con 250 y 1250nM de MeJa. En las concentraciones menores de MeJa, 10 y 50nM el porcentaje de asimilados hacia la parte aérea y radical fue similar al del tratamiento control (Figura 15). La repartición de asimilados hacia la parte aérea en el cultivar Monalisa aumentó con las concentraciones de MeJa; el máximo incremento, un 23% respecto al control, se obtuvo con la concentración de 50nM de MeJa, presentando un efecto muy similar en las concentraciones superiores de MeJa (Figura 15). En el cultivar Kennebec el porcentaje de repartición de asimilados hacia la parte aérea aumentó ligeramente con la concentración de 10nM de MeJa; sin embargo, la porción de asimilados hacia las raíces aumentó un 15% con 1250nM de MeJa respecto al tratamiento control (Figura 15). Todas las concentraciones de MeJa redujeron el porcentaje de asimilados hacia la parte aérea en el cultivar Red Pontiac; con la concentración de 1250nM de MeJa se obtuvo el mayor incremento en el porcentaje de asimilados hacia las raíces; un 87% respecto al tratamiento control (Figura 15).



Figura 16. Desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata después de cuatro semanas de cultivo expuestos a 5 concentraciones de MeJa en el medio de cultivo

4.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este ensayo con los cuatro cultivares de patata en estudio confirman varios de los efectos que provoca la aplicación exógena de jasmonatos sobre el crecimiento y desarrollo en otras especies (Staswick et al., 1992; Toro, 2003). Por otra parte, la respuesta fue similar e independiente del ciclo de maduración de los cuatro cultivares. La aplicación exógena de determinadas concentraciones de MeJa incrementó la longitud de los explantos, el área foliar y el peso seco de los explantos de los cuatro cultivares, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac. También se observó que MeJa redujo la longitud de las raíces, pero a su vez permitió obtener una mayor cantidad de raíces.

La longitud de los explantos de los cuatro cultivares incrementó cuando se cultivaron a concentraciones de 10 y 50nM de MeJa. Al incrementar la concentración aplicada a 250 y 1250nM de MeJa se observó que no se incrementaba más la longitud sino que por el contrario se limitaba su desarrollo, denotando que se había superado la concentración óptima de respuesta. Estos resultados son similares a los observados por otros autores (Pruski et al., 2002; Zhang et al., 2006). La adición de MeJa, cualquiera que fuera la concentración, incrementó el área foliar en todos los cultivares evaluados. Este aumento se había identificado anteriormente en varias especies (Martín-Closas et al., 2000). Adicionalmente, se observó que las hojas de los explantos cultivados con MeJa presentaron síntomas de clorosis de manera similar a la observada por Zhang et al., (2006).

Por otra parte, la longitud del sistema radical de los cuatro cultivares se redujo progresivamente con el incremento de la concentración de MeJa. El efecto negativo sobre la longitud del sistema radical fue observado anteriormente en patata por Pruski et al. (2002), Zhang et al. (2006), Norastehnia et al. (2007) y Martín - Closas (2007) así como en otras especies hortícolas (Toro, 2003; Toro et al., 2003) y en *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 2009). En todos los cultivares la cantidad de raíces aumentó progresivamente con la adición de MeJa al medio de cultivo. Resultados similares han sido descritos en patata (Pruski et al., 2002; Zhang et al., 2006), en maíz (Norastehnia et al., 2007), y en *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 2009).

Sun et al., (2009) utilizando el mutante de *Arabidopsis* para jasmonatos (jdl1/asa 1-1), mutante que no expresa el gen relacionado con MeJa, demostraron que el MeJa tiene un papel importante en la formación de raíces laterales. Por una parte, el MeJa actúa controlando la expresión del gen ASA-1, el cual está relacionado con la biosíntesis de las auxinas y por otra que los jasmonatos son necesarios en el control del transporte y distribución de las auxinas en la zona del meristemo apical de la raíz, necesarias para la formación de raíces laterales. Así, el MeJa es un factor clave en la formación de raíces laterales.

La determinación del peso seco de los explantos mostró que las concentraciones de MeJa 10 y 50nM promovieron un mayor desarrollo de los explantos, mientras que al incrementar a 250 y 1250nM de MeJa el peso seco de explantos no aumentó mucho más en todos los cultivares sino que este incremento fue más reducido en algunos de ellos. Estos resultados concuerdan con los observados por Zhang et al. (2006), quienes demostraron un aumento de la longitud y peso de los explantos de los cultivares de patata Favorita y Helanwuhua cultivados *in vitro* con 0,1 y 1 μ M de JA, mientras a concentraciones mayores, de 100 y 230 μ M de JA, la longitud y peso de los explantos se redujo.

En general, los resultados obtenidos demuestran que para los cultivares de patata Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac las concentraciones de 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa aumentan el peso fresco y seco de los explantos y tiende a incrementar el área foliar, no inhiben totalmente la elongación de las raíces y favorecen la formación de raíces laterales lo cual, es necesario para la absorción de agua y nutrientes para el adecuado desarrollo de la planta.

4.5. CONCLUSIONES

- La aplicación exógena de MeJa promueve el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de patata cultivados *in vitro*.
- Las concentraciones de 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa permiten incrementar el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cultivares de patata; no obstante, la respuesta es dependiente del cultivar y de la concentración de MeJa.
- De forma general, las concentraciones de MeJa entre 10 y 250nM fueron las que permitieron obtener mayor longitud y mayor peso seco de los explantos.
- Una mayor cantidad de raíces y mayor área foliar de los explantos de patata se observó con el incremento progresivo de la concentración de MeJa.
- El aumento de la concentración de MeJa reduce la longitud radical de los explantos; excepto en el cultivar Red Pontiac.
- El efecto de la aplicación exógena de MeJa es independiente del ciclo de maduración de los cuatro cultivares de patata ensayados.

4.6. REFERENCIAS

- Ananieva, K. I; Malbeck, M; Kaminek, J y Van, S. 2004. Methyl jasmonate down-regulates endogenous cytokinin levels in cotyledons of *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings. *Physiologia Plantarum* 122: 496-503.
- Berger, S; Bell, E; Sadka, A y Mullet, J. E. 1995. *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Molecular Biology* 27: 933-942.
- Bialecka, B y Kepczynski, J. 2003. Endogenous ethylene and reversing methyl jasmonate inhibition of *Amaranthus caudatus* seed germination by benzyladenine or gibberellin. *Plant Growth Regulation* 41: 7-12.
- Bunker, T. W; Koetje, D. S; Stephenson, L. C; Creelman, R. A; Mullet, J. E y Grimes, H. D. 1995. Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell* 7: 1319-1331.
- Corbineau, F; Rudnicki, R. M y Come, D. 1988. The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation* 7: 157-169.
- Creelman, R y Mullet, J. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- Czapski, J y Saniewski, M. 1992. Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme in fruits of the non-ripening nor and in tomato mutants by methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* 139: 265-268.
- Dathe, W; Ronsch, H; Preiss, A; Schade, W; Sembdner, G y Schreiber, K. 1981. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (2)-Jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* 155: 530-535.
- Demole, E; Lederer, E y Mercier, D. 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de methyle, cosntituant odorant caracteristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica XLV*: 675-685.
- Farmer, E. E. 2001. Surface to air signals. *Nature* 411: 854-856.

- Feussner, I; Hause, B; Voros, K; Parthier, B; y Wasternack, C. 1995. Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplast of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant Journal* 7: 949-957.
- Grimes, H. D; Koetje, D. S y Franceschi, V. R. 1992. Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. *Plant Physiology* 100: 433-443.
- Hopkins, W y Hüner, N. 2008. Introduction to plant physiology. Fourth ed. New York: Wiley & Sons. 528p.
- Howe, G. A; Lightner, J; Browse, J y Ryan, C. A. 1996. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8: 2067-2077.
- Kepczynski, J y Bialecka, B. 1994. Stimulatory effect of ethephon, ACC, gibberellin A-3 and A-4+7 on germination of methyl jasmonate inhibited *Amaranthus caudatus* L. seeds. *Plant Growth Regulation* 14(3): 211-216.
- Kim, E. H; Park, S. H y Kim, J. K. 2009. Methyl jasmonate triggers loss of grain yield under drought stress. *Plant Signal Behaviour* 4: 348-349.
- Li, L; Zhao, Y; McCaig, B. C; Wingerd, B. A; Wang, J; Whalon, M. E; Pichersky, E y Howe, G. A. 2004. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16: 126-143.
- Martín-Closas, L; Sol, S y Pelacho, A. M. 2000. Potential application of jasmonic acid for *Solanum tuberosum* micropropagation. *Acta Horticulturae* 520: 127-133.
- Martín-Closas, L. 2007. El papel de los jasmonatos en el desarrollo in vitro e in vivo de la planta de patata *Solanum tuberosum* ssp. L. *Tesis Doctoral. Universidad de Lleida. Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería.* 145p.
- McConn, M y Browse, J. 1996. The critical requirement for linolenic acid in pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis mutant. *Plant Cell* 8: 406-416.
- Nibbe, M; Hilpert, B; Wasternack, C; Miersch, O y Apel, K. 2002. Cell death and salicylate- and jasmonate-dependent stress responses in *Arabidopsis* are controlled by single set genes. *Planta* 216: 120-128.
- Nojavan-Asghari, M e Ishizava, K. 1998. Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in cocklebur seeds. *Journal of Plant Growth Regulation* 17: 13-18.

- Norastehnia, R. H; Sajedi, M y Nojavan-Asghari. 2007. Inhibitory effects of methyl jasmonate on seed germination in Maize (*Zea Mays*): Effect on α -amylase activity and ethylene production. *Genetics Applied to Plant Physiology* 33: 13-23.
- Pelacho, A. M y Mingo-Castel, A. M. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured in vitro. *Plant Physiology* 97: 1253-1255.
- Popova, L. P; Tsonev, T. D y Vaklinova, S. G. 1988. Changes in some photosynthetic and photorespiratory properties in barley leaves after treatment with jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* 132: 257-261.
- Preston, C. A; Betts, H y Baldwin, I. T. 2002. Methyl jasmonate as an allelopathic agent: sagebrush inhibits germination of a neighboring tobacco, *Nicotiana attenuata*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 2343-2369.
- Pruski, K; Astatkie, T y Nowak, J. 2002. Jasmonate effects on in vitro tuberization and tuber bulking in two potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) under different media and photoperiod conditions. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 38: 203-209.
- Rao, M. V; Lee, H; Creelman, R. A; Mullet, J. E y Davis, K. R. 2000. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633-1646.
- Ravnikar, M; Vilhar, B y Gogala, N. 1992. Stimulatory effects of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation* 11: 29-33.
- Reymond, P; Weber, H; Damond, M y Farmer, E. E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-720.
- Rossato, L; MacDuff, J. H; Laine, P; Le, Deunff. E y Ourry, A. 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth and VSP accumulation. *Journal of Experimental Botany* 53: 1131-1141.
- Saniewski, M y Czapski, J. 1983. The effect of methyl jasmonate on lycopene and β -carotene accumulation in ripening red tomato. *Experientia* 39: 1373-1374.
- Schillmiller, A. L y Howe, G. A., 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinions in Plant Biology* 8: 369-377.
- Staswick, P. E; Su, W y Howell, S. H. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of National Academic Science* 89: 6837-6840.

- Sun , J; Xu, Y; Jiang, H; Chen, Q; Liu, F; Zhou, W; Chen, R; Li, X; Tietz, O; Wu, X; Cohens, J; Palme, K y Li, C. 2009. *Arabidopsis ASA1* Is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 21: 1495-1511.
- Toro, F. J. 2003. Efecto de los jasmonatos en el desarrollo in vitro e in vivo de especies hortícolas. *Tesis doctoral. Universidad de Lleida. Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería.* 141p.
- Toro, F. J; Martín-Closas, L y Pelacho, A. M. 2003. Jasmonates promote cabbage (*Brassica oleracea* L. var *Capitata* L. root and shoot development. *Plant and Soil* 225(1): 77-83.
- Vijayan, P; Shockey, J; Lévesque, C. A; Cook , R. J y Browse, J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academic Sciences* 95: 7209-7214.
- Wasternack, C y Hause, B. 2002. Jasmonates and Octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72: 165-221.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annual Botany (Lond)*, 100: 681-697.
- Xiao, S; Dai, L; Liu, F; Wang, Z; Peng, W y Xie, D. 2004. COS1: An *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 16:1132-1142.
- Yeh, C. C; Tsay, H. S; Yeh, J. H; Tsai, F. Y; Shih, C. Y y Kao, C. H. 1995. A comparative study of the effects of methyl jasmonate and abscisic acid on some rice physiological processes. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 23-28.
- Yoshihara, T; Omer, E. L; Koshino, H; Sakamura, S; Kikuta, Y y Koda, Y. 1989. Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agriculture and Biological Chemistry* 53: 2835-2837.
- Zhang, Z. J; Zhou, W. J; Li, H. Z y Zhang, G.Q; Subrahmanitan, K y Yu, Q. J. 2006. Effect of Jasmonic acid on in vitro explant growth and microtuberization in potato. *Biologia Plantarum* 50(3): 453-456.

**5. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA SALINIDAD
SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA
DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN**

5. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN

5.1. INTRODUCCIÓN

La salinidad, concentración de sales en el suelo, se presenta por causas naturales o antrópicas, existiendo varios tipos y grados de salinidad y, dependiendo de las sales dominantes en el suelo pueden o no ser perjudiciales para la producción agrícola (Ghosh et al., 2001; Richarson et al., 2001). Las causas más importantes de la salinización de los suelos se deben a una ineficiente gestión del riego, sistemas de drenaje inadecuados, niveles freáticos altos y al uso de agua salina para el riego, lo cual agudiza aún más el problema (Levitt, 1980; Parida y Das, 2005; Levy y Veilleux, 2007). De acuerdo con las estadísticas de FAO (2014), más del 6% de la superficie del planeta presenta problemas de salinidad, llegando a superar los 800 millones de hectáreas afectadas (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de suelos cultivables afectados por la salinidad en el mundo, en millones de hectáreas cultivables.

<i>Regiones</i>	<i>Área total cultivables (M has)</i>	<i>Suelos cultivables afectados por salinidad</i>	
		<i>(M has)</i>	<i>(% has afectadas)</i>
África	1899	38	2,0
Asia y Australia	3107	195	6,3
Europa	2011	6	0,3
América Latina	2039	61	3,0
Oriente Medio	1802	92	5,1
Norte América	1924	4	0,2
Total	12782	396	3,1

Fuente: FAO, 2014.

El problema de la acumulación de sales en el suelo es el producto de una reacción de los cationes calcio, sodio, potasio y magnesio con los aniones cloro, azufre y carbono. Según la unión catión-anión ésta puede ser más o menos perjudicial para la producción agrícola; en este sentido, la acumulación de carbonatos cálcicos y/o magnésicos no es tan perjudicial para los cultivos como los cloruros o sulfatos (Dubey, 1997; Hasegawa

et al., 2000). Altos niveles de cloruro de sodio (NaCl) son la principal causa del estrés salino en los cultivos agrícolas (Marconi et al., 2001). El factor que determina que las sales afecten en mayor o menor grado a un cultivo es su solubilidad en el agua. La solubilidad de la sal está directamente relacionada con la movilidad y precipitación, que permite que ésta pase rápidamente a formar parte de la solución del suelo. En este sentido, las sales más perjudiciales para la producción agrícola son aquellas que presentan mayor solubilidad: cloruros, bicarbonatos y sulfatos, mientras que los carbonatos son sales menos solubles y menos perjudiciales para los cultivos (Dudley, 1992).

A nivel mundial, los ecosistemas que ocupan mayor superficie de suelos salinos son los áridos y semiáridos, que se deben básicamente a la presencia de una alta evapotranspiración del agua y a la baja precipitación, características naturales de estos ecosistemas (Bustan et al., 2004; Zhao et al., 2007). Bajo estas condiciones, el agua asciende por capilaridad del subsuelo, arrastrando las sales hacia los horizontes más superficiales del suelo; una vez aquí, el agua se evapora y las sales se depositan en el estrato superior del suelo, causando efectos perjudiciales a los cultivos.

Por otra parte, la respuesta al estrés salino y el efecto de éste sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas ha sido discutida repetidamente durante varias décadas (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2003; Flowers, 2004; Ewert et al., 2005; Aghaei et al., 2008; Homayoun et al., 2011). La tolerancia a la salinidad se define como la habilidad de las plantas para crecer y completar su ciclo sobre un sustrato que contiene altas concentraciones de sales solubles (Parida y Das, 2005). Según la capacidad innata de las plantas para tolerar condiciones salinas, pueden ser caracterizadas por los cambios fisiológicos en el desarrollo vegetativo y radical cuando están expuestas a diferentes concentraciones salinas y no salinas. Greenway y Munns (1980), Yeo (1998) y Grattan y Grieve (1999) señalan que los efectos negativos del estrés salino sobre las plantas se pueden dividir en tres categorías: a) una reducción en el potencial osmótico de la solución del suelo que reduce el agua disponible, b) un deterioro de la estructura física del suelo, disminuyendo la permeabilidad y aireación del suelo, y c) el incremento en concentración de varios iones que tienen un efecto inhibitorio sobre el metabolismo de la planta y que provocan deficiencias nutricionales y síntomas de toxicidad.

La reducción del crecimiento de la planta es la respuesta inmediata provocada por el estrés salino. Se ha demostrado que características fisiológicas como el área foliar, el peso de hojas, tallos y raíces presentan una reducción significativa con el aumento de la concentración de sales en varias especies, entre otras en manglar, *Rhizophora mucronata*, (Aziz y Khan, 2001), en *Salicornia rubra* (Khan, et al., 2001), en colza, *Raphanus sativus* (Marcelis y VanHooideonk, 1999; Jamil et al., 2007), en tomate, *Lycopersicon esculentum*, (Romero-Aranda et al., 2001), en algodón, *Gossypium spp*, (Meloni, et al., 2001) y en remolacha, *Beta vulgaris* (Ghoulam et al., 2002).

Sin embargo, se han encontrado diferencias en la tolerancia a la salinidad entre especies y cultivares. Levy y Veilleux (2007) indicaron que concentraciones salinas superiores a 10dS/m, que equivale a 86mM de NaCl, en la zona radical afectan severamente al desarrollo y producción de tubérculos de la patata. En la leguminosa *Alhagi pseudoalhagi* el peso de la planta aumentó a una concentración de 50mM NaCl y disminuyó a concentraciones de 100 y 200mM de NaCl respecto al tratamiento sin NaCl (Kurban et al., 1999), en remolacha, *Beta vulgaris*, el área foliar, el peso de hojas y raíces se redujo drásticamente a 200mM de NaCl (Ghoulam et al., 2002). Fisarakis et al. (2001) encontraron que concentraciones de 25, 50 y 100mM de NaCl redujeron significativamente la materia seca en tallos y raíces, la longitud del tallo, el área foliar y el número de hojas por planta en viña, *Vitis vinifera*. Estos resultados sugieren que concentraciones superiores a 50mM de NaCl causan efectos negativos sobre el desarrollo y crecimiento en gran parte de las plantas glicofilas. No obstante, concentraciones menores a 50mM pueden afectar mínimamente el desarrollo de las plantas o bien mostrar un efecto estimulante para su desarrollo y crecimiento.

La patata (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) es uno de los cuatro alimentos de mayor importancia en el mundo (CIP, 2014). En los últimos años la superficie de cultivo del tubérculo ha aumentado en países en desarrollo donde las condiciones de cultivo no son muy favorables, lo que ha generado la necesidad de continuar con la búsqueda de cultivares de patata que presenten mayor tolerancia a condiciones habitualmente limitantes para su cultivo, como es la salinidad. La salinidad actualmente es uno de los mayores problemas para la agricultura mundial (Allakhverdiev et al., 2000; Bustan et al., 2004) y en especial para la producción de hortalizas en regiones como la mediterránea (Ondarza, 1982; Levy, 1992; Zhao et al., 2007).

La patata está adaptada a diferentes zonas climáticas y agro-económicas, lo que hace que este cultivo tenga importancia desde hace tiempo en muchos países a nivel mundial (Struik y Wiersema, 1999). Según la clasificación de tolerancia a salinidad de cultivos propuesta por Van Hoorn, et al. (1993), que utiliza el método de los lisímetros, se clasifica a la planta de patata como sensible a la salinidad frente al trigo, especie más tolerante a la salinidad. Por otra parte, Katerji et al. (2000) utilizando como criterio de clasificación el potencial de agua en las hojas, clasifica a la patata como tolerante a la salinidad al igual que el trigo y la remolacha. No se ha encontrado un acuerdo entre los dos autores frente a esta discrepancia, sin embargo, es bien conocido que las hojas de patata son sensibles al agua salina y que el riego salino afecta severamente su desarrollo (Meiri y Plaut, 1985; Maas, 1985). Fidalgo et al. (2004) demostraron que el estrés salino afecta negativamente a la conductancia estomática y a la tasa de transpiración en el cultivar de patata Désirée. Teniendo en cuenta la sensibilidad de la planta de patata a la salinidad y la importancia de este cultivo, sorprende la escasa investigación realizada sobre su tolerancia, lo cual requiere un mayor conocimiento previo de la fisiología del estrés salino en patata (Levy y Veilleux, 2007).

El cultivo de secciones nodales es una de las técnicas para la selección, caracterización de cultivares y para el estudio de los mecanismos responsables de la tolerancia a la salinidad (Prasad y Potluri, 1996; Zhang y Donnelly, 1997; Ochatt, et al., 1998; Nalk y Wildholm, 1993; Potluri y Prasad, 1993). Por otra parte, diversas investigaciones demuestran que el cultivo *in vitro* permite caracterizar y seleccionar cultivares resistentes y tolerantes frente a diferentes tipos de estreses bióticos o abióticos. Por ejemplo, Demagante et al. (1995) utilizaron secciones apicales para seleccionar genotipos para tolerancia a la sequía en patata. Gopal y Minocha (1998) compararon la efectividad de la selección de caracteres agronómicos *in vitro* e *in vivo* en patata, encontrando relación entre ellos. Gopal e Iwama (2007) seleccionaron *in vitro* cultivares de patata tolerantes al estrés hídrico.

El objetivo del presente experimento fue caracterizar *in vitro* cuatro cultivares de patata de diferente ciclo de maduración, respecto a la salinidad causada por un rango de concentraciones en base a caracteres fisiológicos de desarrollo vegetativo y radical, principalmente en base al peso seco de explanto.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este ensayo se utilizó la metodología descrita en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, variando únicamente en la adición de las concentraciones de NaCl. Para cada uno de los cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac se utilizó un total de 20 secciones nodales. Las secciones nodales se cultivaron en el medio MS con 3% sacarosa, pH ajustado a 5,7-5,8 y con la adición de 5 concentraciones de NaCl: 0, 30, 60, 90, 120mM. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado en una gradilla plástica.

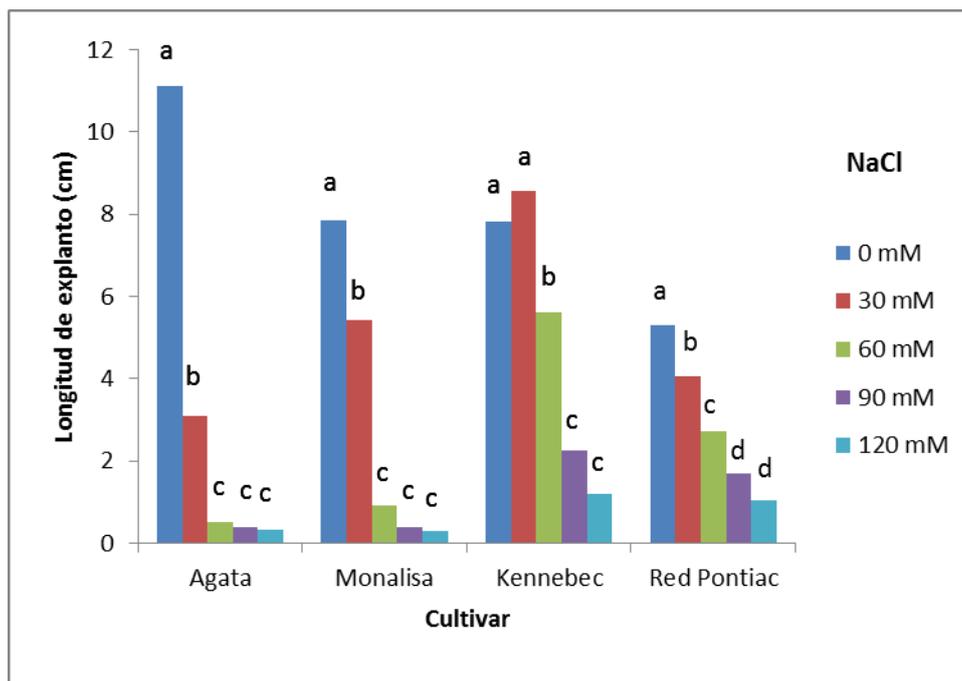
La evaluación del efecto del estrés salino sobre los explantos de cada cultivar se realizó evaluando el desarrollo vegetativo y radical de los 20 explantos al final de cuatro semanas de cultivo. El análisis de la tolerancia a la salinidad en cada uno de los cultivares se determinó en base al desarrollo vegetativo y radical de los explantos y con especial atención en el peso seco de los explantos respecto a los explantos cultivados en ausencia de salinidad.

Las variables evaluadas fueron: la longitud de explanto (LE) y del sistema radical (LSR) se registró utilizando una regla milimétrica. La cantidad de raíces (CR) se determinó de forma visual en base a una escala establecida de 0 a 4 de acuerdo al número de raíces, 0 = ninguna, 1= 1-3 raíces, 2= 4-6 raíces, 3= 7-10 raíces y 4= más de 10 raíces. El peso fresco (PFE) y seco de los explantos (PSE), (incluye raíz - tallo - hojas), el peso seco de hojas (PSH) y raíces (PSR) se registraron utilizando una balanza de precisión de $1 \pm 0,1$ mg. El área foliar (AF) de los explantos se determinó utilizando el medidor de área foliar (mm^2) AM-100 (ADC).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA para cada parámetro evaluado en cada uno de los cuatro cultivares expuestos a las concentraciones de NaCl. En su caso la separación de medias se obtuvo empleando el test de Tukey ($p < 0,05$) del paquete estadístico SAS versión 9.

5.3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los cuatro cultivares de patata en estudio muestran el efecto negativo del estrés salino sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos; el efecto negativo de la salinidad aumentó proporcionalmente con el incremento de la concentración de NaCl aunque con una dinámica diferente en función del cultivar (Figura 23).

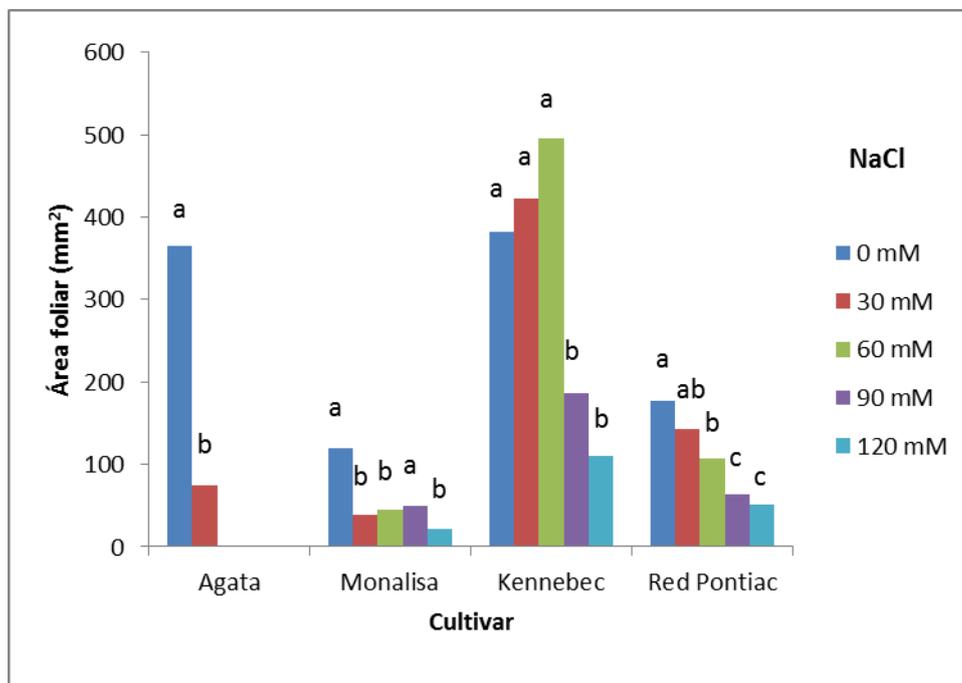


*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 17. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre la longitud de los explantos de los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio de 20 explantos.

El aporte de la salinidad al medio de cultivo redujo progresiva y significativamente la longitud de los explantos de los cuatro cultivares de patata evaluados en este experimento (Figura 17; Figura 23). En el cultivar Agata, incluso los explantos expuestos a la mínima concentración de NaCl ensayada, 30mM, presentaron una disminución significativa, del 72% de su longitud (Figura 17). Los explantos expuestos a concentraciones de salinidad mayores, 60, 90 y 120mM, prácticamente no se desarrollaron (Figura 17). En el cultivar Monalisa la longitud de los explantos se redujo significativamente en un 31% en relación al tratamiento sin estrés cuando se trataron con 30mM de NaCl (Figura 17); igual que en el cultivar Agata, la exposición a un estrés salino mayor, inhibió totalmente el desarrollo de los explantos (Figura 17).

Por otra parte, los explantos del cultivar Kennebec no redujeron su longitud a la concentración salina de 30mM (Figura 17); no obstante, al aumentar la salinidad a concentraciones de 60, 90 y 120mM, la longitud se redujo en un 50, 68 y 80%, respectivamente (Figura 17). En el cultivar Red Pontiac, el estrés salino redujo progresiva y significativamente la longitud de los explantos (Figura 17); en la concentración de 30mM de NaCl la longitud de los explantos fue un 23% menor que sin NaCl (Figura 17). A concentraciones salinas de 60, 90 y 120mM, los explantos registraron una disminución significativa del 50, 68, 80% de su longitud (Figura 17; Figura 23).

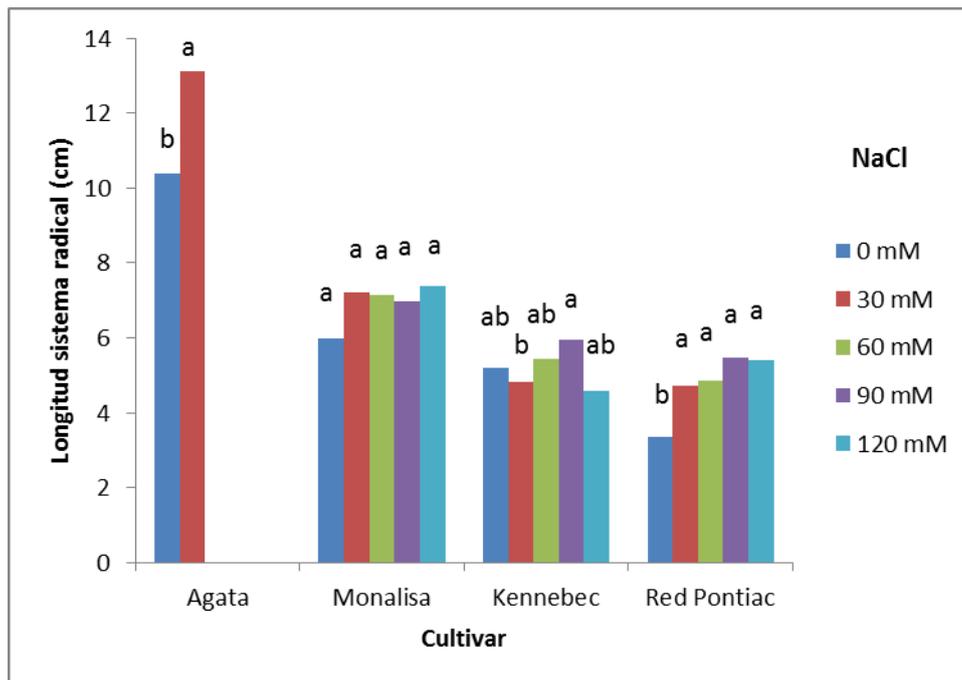


*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 18. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre el área foliar de los explantos de los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio de 20 explantos.

Al igual que en la longitud de explanto analizada anteriormente, el estrés salino redujo significativamente el área foliar de los explantos de los cuatro cultivares de patata en estudio (Figura 18; Figura 23). En el cultivar Agata, la adición de 30mM de NaCl redujo significativamente el área foliar de los explantos en un 80% (Figura 18), mientras que, a concentraciones salinas superiores el desarrollo foliar se inhibió casi por completo (Figura 18). En el cultivar Monalisa, el aumento de la salinidad provocó la disminución significativa del área foliar de los explantos (Figura 18); los explantos

expuestos a las menores concentraciones de salinidad, 30 y 60mM, presentaron una disminución significativa entre el 60 y el 70% frente a los explantos cultivados sin salinidad (Figura 18). La mayor reducción del área foliar, un 82%, se obtuvo con la concentración máxima de NaCl (Figura 18). En el cultivar Kennebec, las concentraciones de 30 y 60 mM de NaCl no afectaron significativamente al desarrollo foliar de los explantos sino que incluso se obtuvieron mayores valores un 10 y un 30% superiores respecto al tratamiento sin salinidad, respectivamente (Figura 18). A concentraciones salinas de 90 y 120mM el área foliar de los explantos se redujo significativamente (Figura 18). En el cultivar Red Pontiac los explantos expuestos a la concentración mínima de salinidad no disminuyeron significativamente su área foliar frente al tratamiento sin salinidad (Figura 18); a la concentración de 60mM de NaCl, la reducción si fue significativa, un 40% menos (Figura 18), mientras que en los medios con mayor salinidad, 90 y 120mM, la reducción alcanzó el 64 y 71% respectivamente (Figura 18; Figura 23).

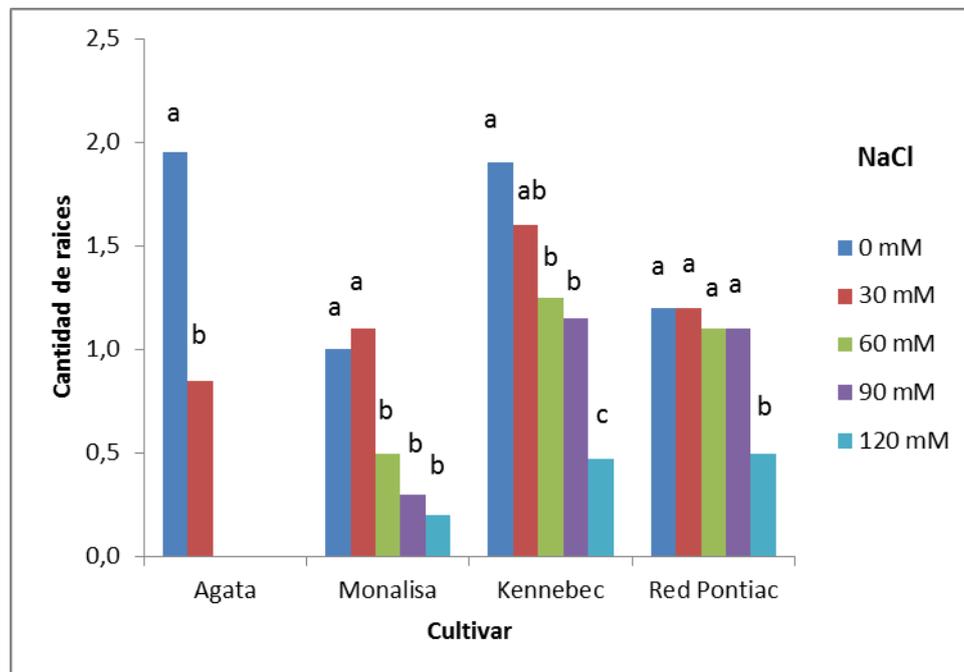


*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 19. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre la longitud del sistema radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio de 20 explantos.

En el cultivar Agata, la concentración salina de 30mM permitió incrementar significativamente un 21% la longitud del sistema radical (Figura 19). Sin embargo, al

incrementar la salinidad en el medio de cultivo el desarrollo de las raíces se inhibió totalmente. En los cultivares Monalisa y Kennebec las concentraciones de salinidad ensayadas no afectaron significativamente a la longitud del sistema radical de los explantos (Figura 19). No obstante, los valores de longitud del sistema radical obtenidos en el cultivar Monalisa expuestos a todas las concentraciones de NaCl fueron ligeramente superiores a los del tratamiento control (Figura 19). En el cultivar Red Pontiac, la adición de NaCl al medio de cultivo, en cualquiera de las concentraciones evaluadas, provocó el aumento significativo de la longitud del sistema radical de los explantos respecto al tratamiento sin salinidad (Figura 19), las concentraciones de 30 y 60mM de NaCl permitieron incrementar la longitud del sistema radical en un 40 y 44% y las concentraciones de 90 y 120 un 62 y 60%, respectivamente (Figura 19; Figura 23).

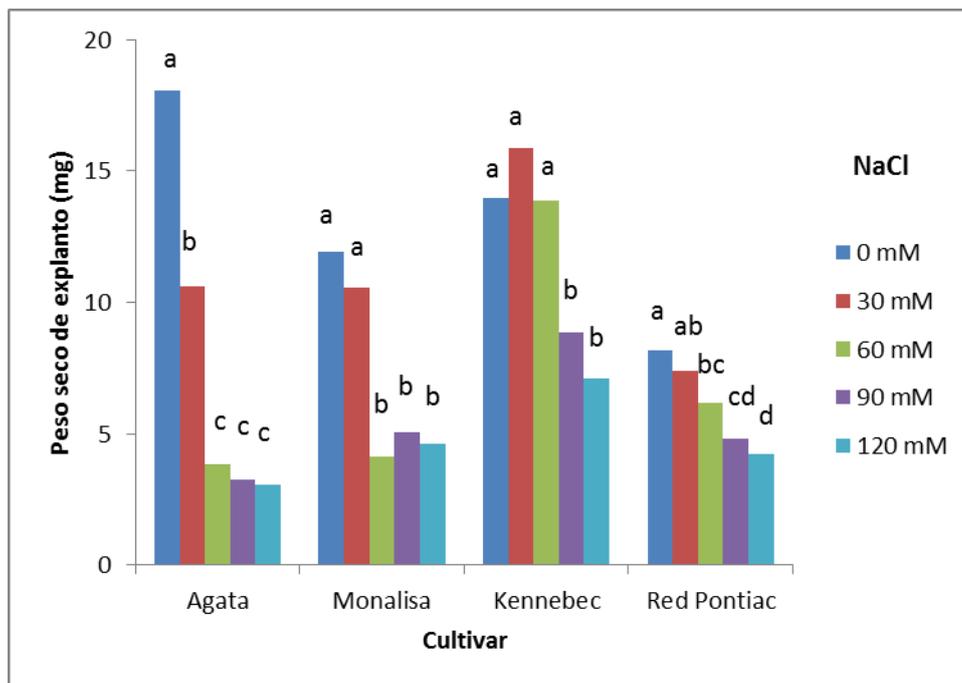


*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 20. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre la cantidad de raíces de los explantos de los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio de 20 explantos.

El estrés salino provocado por la exposición de los explantos a las diferentes concentraciones de NaCl, provocó la disminución significativa de la cantidad de las raíces en todos los cultivares evaluados (Figura 20; Figura 23). De nuevo los efectos fueron diferentes en función del cultivar. En los explantos del cultivar Agata, la menor concentración salina, 30mM, redujo significativamente en un 56% la cantidad de raíces respecto al tratamiento sin salinidad (Figura 20); concentraciones salinas superiores a

30mM inhibieron totalmente el desarrollo radical de los explantos (Figura 20). En el cultivar Monalisa la cantidad de raíces se redujo de forma significativa a medida que se incrementó la concentración salina en el medio de cultivo por encima de 30mM (Figura 20); los tratamientos de 60, 90 y 120mM de NaCl redujeron la cantidad de raíces de los explantos entre el 50 y 80% (Figura 20). Por otra parte, en el cultivar Kennebec la cantidad de raíces se redujo un 34% cuando los explantos se cultivaron en la concentración salina de 60mM (Figura 20); a mayores concentraciones salinas en el medio de cultivo, la cantidad de raíces de los explantos se redujo un 40 y 75% (Figura 20). En el cultivar Red Pontiac, la cantidad de raíces no presentó disminución significativa cuando los explantos se cultivaron a salinidades de hasta 90mM (Figura 20); sólo la concentración máxima de NaCl, 120mM, redujo significativamente la cantidad de raíces, en un 58% (Figura 20; Figura 23).



*Letras diferentes por cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

** Peso seco de explanto incluye (raíces - tallos - hojas).

Figura 21. Efecto de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo sobre el peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio de 20 explantos.

En todos los cultivares ensayados el peso seco de los explantos se redujo significativamente con el aumento de la salinidad (Figura 21; Figura 23). En el cultivar Agata, la concentración salina de 30mM redujo significativamente el peso seco de los explantos, un 40% (Figura 21); a concentraciones salinas superiores, en que el explanto

apenas se desarrolló, la reducción fue de aproximadamente un 80%, correspondiente al peso seco de la sección nodal inicial (Figura 21).

El peso seco de los explantos del cultivar Monalisa se redujo entre un 57 y 65% cuando los explantos se cultivaron con las concentraciones de 60, 90 y 120mM de NaCl (Figura 21). En el cultivar Kennebec el aumento de la salinidad también provocó la disminución significativa del peso seco de los explantos (Figura 21), sin embargo, éste no varió al ser cultivado con las concentraciones salinas de 30 y 60mM (Figura 21). Las concentraciones de 90 y 120mM sí redujeron significativamente el peso seco de los explantos, en un 41 y 48%, respectivamente (Figura 21). En el cultivar Red Pontiac el peso seco de los explantos se redujo significativamente cuando se desarrollaron en concentraciones salinas de 60, 90 y 120mM, y alcanzó el 48% con la concentración salina más alta (Figura 21; Figura 23).

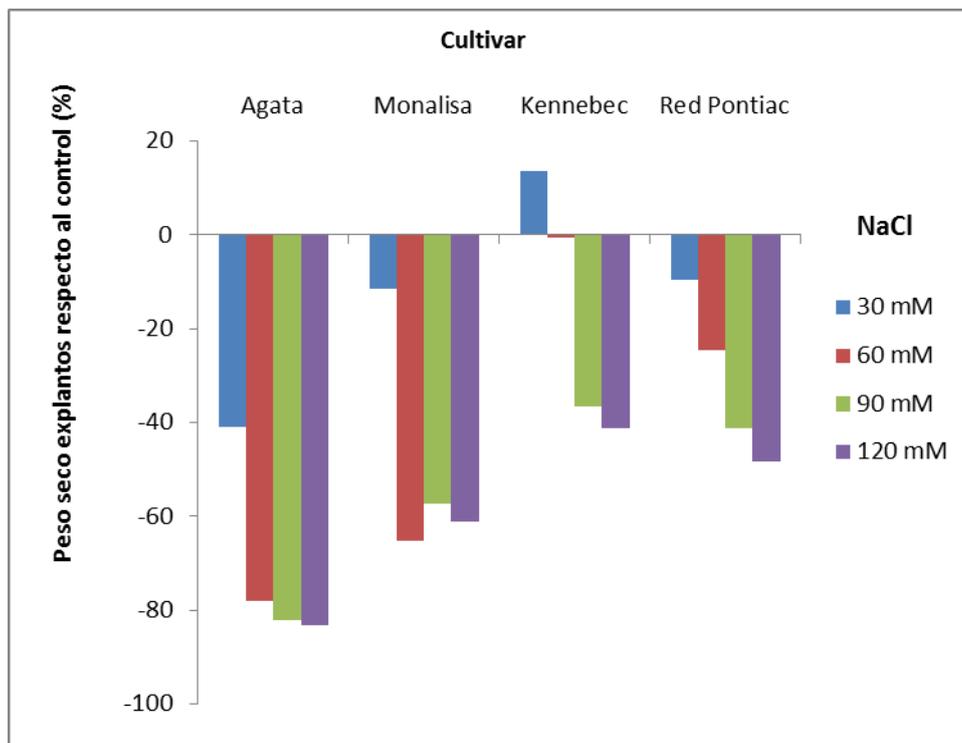


Figura 22. Porcentaje de variación del peso seco debido a las concentraciones de NaCl respecto al control para cada uno de los cultivares de patata. Los resultados corresponden al promedio de 20 explantos.

En la Figura 22 se presenta el porcentaje de variación del peso seco de los explantos causado por los tratamientos de salinidad respecto al control y en función del cultivar. El cultivar Agata mostró, con diferencia, ser el menos tolerante a la salinidad. El cultivar Monalisa mostró ser ligeramente más tolerante que Agata, especialmente a la

menor concentración salina evaluada, 30mM. El cultivar Kennebec fue el que mayor tolerancia al estrés salino presentó; en este cultivar, la concentración de 30mM de NaCl promovió el desarrollo de los explantos, mientras que la concentración de 60mM prácticamente no afectó al desarrollo frente al control. Finalmente, el cultivar Red Pontiac presentó niveles de tolerancia ligeramente superiores a Monalisa a 30mM de NaCl; a concentraciones superiores la tolerancia de este cultivar fue mayor respecto a Monalisa y similar a Kennebec a 90 y 120mM de NaCl.

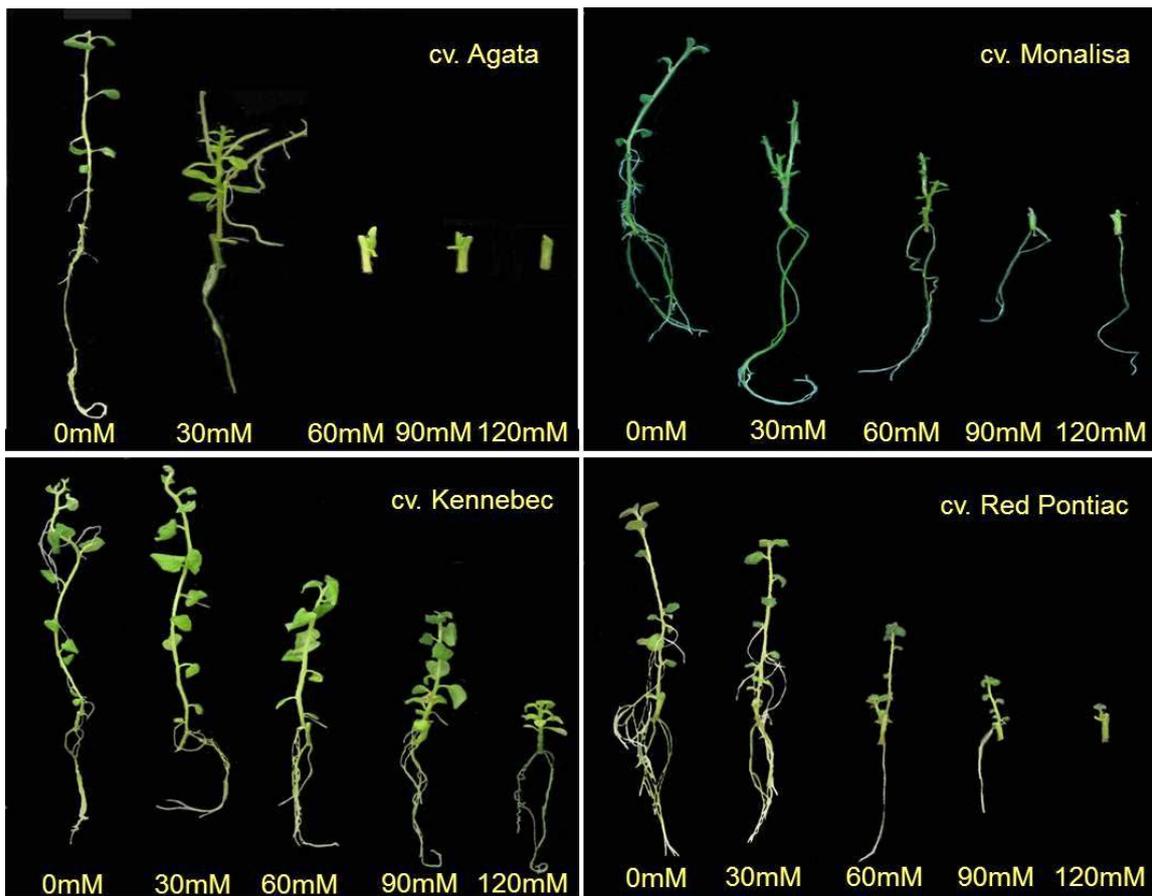


Figura 23. Desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a 5 concentraciones de NaCl en el medio de cultivo después de cuatro semanas de cultivo.

5.4. DISCUSIÓN

De forma general, los efectos del estrés salino sobre los cultivares de patata *in vitro* observados en este experimento son similares a los reportados por varios autores en patata y en otras especies vegetales cultivadas *in vivo* e *in vitro*. El estrés salino es conocido por causar efectos adversos sobre el desarrollo de las plantas incluyendo la disminución de la longitud de los explantos, el peso de las hojas, la cantidad y número de raíces, el peso de raíces y el peso seco de los explantos (Elkhatib et al., 2004; Flowers, 2004; Aghaei et al., 2009; Pour et al., 2010). De forma general en las plantas glicofitas hortícolas el crecimiento se ve severamente afectado cuando son expuestas a concentraciones salinas superiores a 60 y 70mM de NaCl, lo que equivale aproximadamente a una conductividad eléctrica (CE) del suelo de 6 y 7dS/m (Katerji, et al., 2000). Fidalgo, et al. (2004) y Texeira y Pereira (2007) observaron una reducción de la altura de la planta, del área foliar y de la tuberización en plantas de patata del cultivar Desirée cultivadas en invernadero y expuestas a concentraciones salinas de 100 y 200mM de NaCl. Por otra parte, Pour, et al. (2010) observaron la inhibición de crecimiento y enraizamiento en explantos de varios clones de patata cultivados *in vitro* con concentraciones de 25, 50, 75 y 100mM de NaCl, variando la respuesta o tolerancia al estrés salino entre los clones evaluados.

Recientemente, Aghaei et al. (2009) observaron *in vitro* los efectos negativos de concentraciones crecientes hasta 120mM de salinidad sobre la longitud, peso fresco y seco de explantos de los cultivares Kennebec y Concord. En este sentido, los resultados obtenidos en nuestro experimento con los cuatro cultivares de patata ensayados coinciden claramente con los efectos negativos de las concentraciones salinas sobre el desarrollo vegetativo y radical observados por Aghaei et al. (2009). Sin embargo, en nuestro experimento la tolerancia al estrés salino fue diferente entre los cultivares evaluados, lo cual posiblemente se debe a las características genotípicas propias de cada uno de los cultivares y de su manifestación en el ambiente concreto del ensayo o también puede estar influenciada por la duración del ciclo de maduración (Shaterian et al., 2005).

Los tratamientos salinos tuvieron mayor incidencia sobre los cultivares Agata y Monalisa. El peso seco de los explantos del cultivar Agata se redujo significativamente con un estrés salino de 30mM y al aumentar la concentración de NaCl el desarrollo cesó totalmente. En el cultivar Monalisa el efecto fue similar, a 30mM de NaCl el peso seco se redujo pero en menor grado que en Agata y a concentraciones salinas más altas el desarrollo se redujo significativamente. Mientras, en los cultivares Kennebec y Red Pontiac el peso seco de los explantos se redujo con el incremento del estrés salino, pero en menor grado que el observado en los cultivares Agata y Monalisa. De ellos el cultivar Kennebec fue el menos afectado por el estrés salino e incluso algunos de los parámetros analizados mostraron valores medios ligeramente superiores a los de los explantos control cuando se cultivó con 30mM de NaCl; con 60mM de NaCl este cultivar prácticamente no presentó diferencias con el tratamiento sin estrés salino. En estudios *in vitro* previos se observó que explantos de los cultivares Kennebec y Concord alcanzaron un desarrollo vegetativo y radical similar que el control cuando se cultivaron con 30mM de NaCl; al aumentar la salinidad a 60, 90 y 120mM el desarrollo vegetativo y radical de ambos cultivares se redujo significativamente pero, esta reducción fue menor en el cultivar Kennebec (Aghaei et al., 2008; Aghaei et al., 2009).

Las diferencias tan marcadas en el efecto de la salinidad sobre el peso seco de los cultivares Agata y Monalisa y los cultivares Kennebec y Red Pontiac, apuntan a que no existe una relación de mayor tolerancia al estrés salino dependiente del ciclo de maduración de cada cultivar. Sin embargo, Shaterian et al. (2005) demostraron la diferencia de respuesta al estrés salino entre cultivares de patata de ciclo temprano y tardío; concluyendo que los cultivares tempranos acumulan el Na⁺ en las hojas como respuesta al estrés salino y los cultivares más tardíos acumulan el Na⁺ en las raíces. Los cultivares más tardíos desarrollan un sistema radical mayor, lo cual posiblemente contribuye una absorción continua de agua y nutrientes y evita, por exclusión, que el sodio que llegue a las hojas (Shaterian et al., 2005). La exclusión del ion sodio posiblemente es el mecanismo de respuesta al estrés salino que evita que el sodio llegue a las hojas y cause su deshidratación, clorosis y senescencia, fenómeno que es conocido como tolerancia al estrés salino (Shaterian et al., 2005). En situaciones de estrés salino es fundamental que la planta tenga la capacidad de mantener un adecuado flujo de agua interno, lo que permite mantener la transpiración y el crecimiento (Pour et al., 2010).

En este sentido, la disminución o inhibición completa del desarrollo del sistema radical, en longitud y cantidad de raíces, de los explantos de los cuatro cultivares expuestos al estrés salino estaría impidiendo la normal absorción de agua y nutrientes que sería la causa del menor desarrollo vegetativo registrado en los explantos.

Los resultados obtenidos muestran los efectos adversos del estrés salino sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos, los cultivares tardíos fueron menormente afectados que en los más tempranos, indicando una mayor tolerancia de los primeros al estrés salino. Teniendo en cuenta los resultados de los cultivares tardíos y partiendo del hecho que plantas más tolerantes al estrés salino alcanzan un mayor desarrollo vegetativo y radical que las menos tolerantes, varios estudios realizados en tomate, *Lycopersicum esculentum*, (Hajer et al., 2006), en vinca de Madagascar, *Catharanthus roseus*, (Jaleel et al., 2008), en maíz, *Zea mays*, (Khatoon et al., 2010) y en algodón, *Gossypium hirsutum*, (Saleh, 2012), demuestran que el peso seco de las plantas es uno de los principales indicadores de tolerancia a la salinidad y que permite, a priori, clasificar cultivares. En este sentido y utilizando el peso seco como indicador de tolerancia y la duración del ciclo de maduración, los resultados de este experimento sugieren que el cultivar Kennebec es el más tolerante al estrés salino seguido muy de cerca por el cultivar Red Pontiac y a mucha mayor distancia por los cultivares Monalisa y Agata.

Por otra parte, Elhag (1991) demostró la correlación entre los resultados de tolerancia a la salinidad obtenidos *in vitro* con los obtenidos en campo. Al comparar 86 genotipos de patata, expuestos a concentraciones salinas de 40, 80 y 120mM, la longitud del tallo y peso fresco disminuyó con el aumento de la concentración salina tanto en los cultivados *in vitro* como los cultivados en campo y comprobando la acumulación de los iones Na^+ y Cl^- en los tejidos, resultados que concuerdan con los nuestros sobre la efectividad del sistema *in vitro* como herramienta útil y eficaz para la selección de cultivares con tolerancia a la salinidad y otros factores abióticos.

5.5. CONCLUSIONES

- El estrés salino reduce el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares ensayados.
- El desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cultivares más tempranos, Agata y Monalisa, se ve muy afectado por el estrés salino.
- El desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cultivares más tardíos, Kennebec y Red Pontiac se ve menos afectado por el estrés salino respecto a Agata y Monalisa, mostrando que son tolerantes a un cierto nivel de salinidad.
- El cultivar semi tardío Kennebec es el más tolerante al estrés salino.

5.6. REFERENCIAS

Aghaei, K; Ehsanpour, A; Balali, G y Mostajeran, A. 2008. In vitro screening of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars for salt stress tolerance using physiological parameters and RAPD analysis. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 3(2): 159-164.

Aghaei, K; Ehsanpour, S y Komatsu, S. 2009. Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *Journal of Integrative Plant Biology* 51: 1095-1103.

Allakhverdiev, S. I; Sakamoto, A; Nishiyama, Y; Inaba, M y Murata, N. 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystem I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology* 123:1047-1056.

Aziz, I y Khan, M. A. 2001. Effect of seawater on the growth, ion content and water potential of *Rhizophora mucronata* Lam. *Journal of Plant Research* 114: 369-373.

Bustan, A; Sagi, M; De-Malach, Y y Paternak, D. 2004. Effects of saline irrigation water and heat waves on potato production in an arid environment. *Field Crops Research* 90: 275-285.

CIP. 2014. *Datos y cifras sobre la papa*. [En línea]. www.cippotato.org. [Último acceso: 21 2014].

Demagante, A. L; Harris, P. M y Vanderzaag, P. 1995. A promising method for screening drought tolerance in potato using apical cuttings. *American Potato Journal* 72: 577-588.

Dubey, R. S. 1997. *Photosynthesis in plants under stressful conditions*. En: Pessaraki (ed): *Handbook of photosynthesis*. New York: M. 859-875p.

Dudley, L. M. 1992. *Salinity in the soil environment*. En: Pessaraki (ed): *Handbook of plant and crop stress*. New York: M. 13-30p.

Elhag, A. Z. 1991. Eignung von in vitro verfahren zur Charakterisierung der Salztoleranz bei Solanum-arten. *Vom Fachbereich Gartenbau der Universität, Hannover*. 148 p.

Elkhatib, H. A; Elkhatib, E. A; Khalaf-Allah, A. M y Sharkawy, A. M. 2004. Salt tolerance of four potato cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 27: 1575-1583.

- Ewert, F; Rounsevel, M. D. A; Reginster, I; Metzger, M. J y Leemans, R. 2005. Future scenarios of European agricultural land use I. Estimating changes in crop productivity. *Agriculture Ecosystems and Environment* 10:101-116.
- FAO, 2014. *FAOSTAT. Estadísticas de cultivos por países*. [En línea] www.faostat.org [Último acceso: 2 01 2014].
- Fidalgo, F; Santos, A; Santos, I y Salema, R. 2004. Effects on long-term salt stress on antioxidant defense systems, leaf water relation and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annual of Applied Biology* 145: 185-192.
- Fisarakis, I; Chartzoulakis, K y Stavrakas, D. 2001. Response of Sultana vines (*Vitis vinifera* L.) on six rootstocks to NaCl salinity exposure and recovery. *Agriculture Water Management* 51: 13-27.
- Flowers, T. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55(396): 307-319.
- Ghosh, S. C; Asanuma, K; Kusutani, A y Toyota, M. 2001. Effect of salt stress on some chemical components and yield of potato. *Soil Science and Plant Nutrition* 47: 467-475.
- Ghoulam, C; Foursy, A y Fares, K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 47: 39-50.
- Gopal, J e Iwama, K. 2007. In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports* 26: 693-700.
- Gopal, J y Minocha, J. L. 1998. Effectiveness of in vitro selection for agronomic characters in potato. *Euphytica* 103: 67-74.
- Grattan, S. R y Grieve, C. M. 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Science Horticulture* 78: 127-157.
- Greenway, H y Munns, R. 1980. Mechanisms of salt-tolerance in nonhalophytes. *Annual Reviews in Plant Physiology* 31: 149-190.
- Hajer, A. S; Malibari, H. S; Al-Zahrani y Almaghrabi, O. A. 2006. Responses of three tomato cultivars to sea water salinity. Effect of salinity on seedling growth. *African Journal of Biotechnology* 5: 855-861.
- Hasegawa, P; Bresa, R; Zhu, J y Bohnert, H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

- Homayoun, H; Mehrabi, P y Daliri, M. D. 2011. Study of salinity stress on two potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars in vitro. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 11(5): 729-732.
- Jaleel, C. A; Sankar, R; Sridharan, R y Pannerselvam, R. 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content and secondary metabolite accumulation in *Cathartus roseus*. *Turkish Journal of Botany* 32: 79-83.
- Jamil, Muhammad; Rehman, S; Lee, K. J; Kim, J M; Kim, H y Rha, E. S. 2007. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. *Scientia Agricola* 66(2): 111-118.
- Katerji, N; Van, H; Hamdy, J. W y Mastrorilli, M. 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management* 43: 99-109.
- Khan, A. A; Gul, B y Weber, J. 2001. Effects of salinity on the growth and ion content of *Salicornia Rubra*. *Commun. Soil Science Plant Analysis* 32: 2965-2977.
- Khatoon, T; Hussain, K; Majeed, A; Nawas, K y Nisar, M. F. 2010. Morphological variations in maize (*Zea mays* L.) under different levels of NaCl at germinating stage. *World Applied Sciences Journal* 8: 1294-1297.
- Kurban, H; Saneoka, H; Nehira, K y Adilla, R. 1999. Effect of salinity on growth, photosynthesis in leguminous plant *Alhagi pseudoalhagi*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 45: 851-862
- Levitt, J. 1980. *Responses of plant to environmental stresses*. Second ed. New York: Academic Pres. 607p.
- Levy, D. 1992. The response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to salinity: Plant growth and tuber yields in the arid desert of Israel. *Annual Applied Biology* 120: 547-555.
- Levy, D y Veilleux, R. 2007. Adaptation of potato to high temperatures and salinity. A Review. *American Journal of Potato Research* 84: 487-506.
- Maas, E. 1985. Crop tolerance to saline sprinkling water. *Plant Soil* 89: 273-284.
- Marcelis, L. F y VanHooideonk, J. 1999. Effect of salinity on growth, water use and nutrient in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* 215: 51-64.

- Marconi, P. L; Benavides, M. P y Caso, O. H. 2001. Growth and physiological characterization of regenerated potato (*Solanum tuberosum*) plants affected by NaCl stress. *New Zeland Journal of Crop Horticultural Science* 29: 45-50.
- Meiri, A y Plaut, Z. 1985. Crop production and management under saline conditions. *Plant Soil* 89: 253-271.
- Meloni, D. A; Oliva, M. A; Ruiz, H. A y Martínez, C. A. 2001. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 24: 599-612.
- Nalk, P. S y Wildholm, J. M. 1993. Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55: 14.
- Ochatt, S. J; Marconi, P. L; Radice, S; Aenozi, P. A y Caso, O. H. 1998. In vitro recurrent selection of potato: Production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14(55): 1-8.
- Ondarza, R. N.1982. Biosaline Research: *A Look to the Future, Second Intern Workshop on Biosaline Research*. En: A San Pietro (ed), La Paz, Mexico. New York: Plenum Pres. 578p.
- Parida, A y Das, A. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(3): 324-349.
- Potluri, S. D y Prasad, P. V. 1993. Influence of salinity on axillary bud cultures of six lowland tropical varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 32: 185-191.
- Pour, S. M; Majidi, I; Omid, M; Davodi, D y Tehrani, A. P. 2010. In vitro plantlet propagation and microtuberization of meristem culture in some wild and commercial potato cultivars as affected by NaCl. *African Journal of Agriculture Research* 5(4): 268-274.
- Prasad, P. V y Potluri, S. D. 1996. Influence of proline and hydroxyproline on salt-stressed axillary bud cultures of two varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *In Vitro Cellular Developmental Biology* 32: 47-50.
- Richardson, K. V; Wetten, A. C y Caligari, P. D. 2001. Cell and nuclear degradation in root meristems following exposure of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to salinity. *Potato Research* 44: 389-399.
- Romero-Aranda, R; Soria, T y Cuartero, J. 2001. Tomato plant water uptake and plant water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* 160: 265-272.

- Saleh, B. 2012. Salt stress alters physiological indicators in cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Soil Environment* 31(2): 113-118.
- Shaterian, J; Waterer, D; De Jong, H y Tanino, K. K. 2005. Differential stress responses to NaCl salt application in early and late maturing diploid potato (*Solanum* sp.) clones. *Environmental Experimental Botany* 54: 202-212.
- Struik, P. C y Wiersema, S. G. 1999. Seed potato technology. *Wageningen Pers.*383p.
- Texeira, J y Pereira, S. 2007. High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 60: 121-126.
- Van Hoorn, J; Katerji, N; Hamdy, A y Mastrorilli, M. 1993. Effect of saline water on soil salinity and on water stress, growth, and yield of wheat and potatoes. *Agricultural Water Management* 23: 247-265.
- Yeo, A. R. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 49: 915-929.
- Zhang, Y. L y Donnelly, D. J. 1997. In vitro bioassays for salinity tolerance screening of potato. *Potato Research* 40: 285-295.
- Zhao, M. G. Tian, Q. Y y Zhang, W. H. 2007. Nitric oxide synthase dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 206-217.
- Zhu, J. K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinions in Plant Biology* 6: 441-445.

6. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POSIBLE EFECTO PROTECTOR DEL METIL JASMONATO AL ESTRÉS SALINO SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN

6. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POSIBLE EFECTO PROTECTOR DEL METIL JASMONATO AL ESTRÉS SALINO SOBRE EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN

6.1. INTRODUCCIÓN

La salinidad de los suelos constituye uno de los principales factores actualmente limitantes de la producción agrícola, afectando extensas áreas en regiones áridas y semiáridas del mundo (FAO, 2014). Ante la eminente disminución de las áreas agrícolas provocada por el crecimiento exponencial de la población mundial y la limitación del uso de agua dulce en la agricultura, se hace necesario continuar en la búsqueda de técnicas para obtener y seleccionar cultivares tolerantes a la salinidad que puedan producir en suelos salinos, ser regados con agua que contenga sales sin que su producción se vea comprometida. El cultivo *in vitro* ha sido ampliamente utilizado para la propagación a gran escala y la mejora de especies vegetales, entre otros, ha permitido investigar y mejorar el cultivo de patata; esta técnica permite controlar las condiciones ambientales y nutricionales de los explantos, facilita la obtención de plantas libres de virus, la conservación e intercambio de germoplasma, y permite realizar procesos de organogénesis, variación somaclonal, y manipulación genética (Donnelly et al., 2003; Elkhatib et al., 2004; Munns y Tester, 2008).

Altas concentraciones salinas incrementan los niveles de hormonas vegetales en las plantas como el ABA, las citoquininas, o los jasmonatos, entre otras (Parida y Das, 2005). El metil jasmonato y su ácido libre, el ácido jasmónico, colectivamente denominados jasmonatos, son importantes reguladores relacionados con diversos procesos de desarrollo, como la germinación de semillas, el crecimiento radical, la maduración y senescencia de los frutos (Creelman y Mullet, 1997; Rao et al., 2000; Wasternack y Hause, 2002); también incrementan la tasa de tuberización en explantos de patata *in vitro* (Pelacho y Mingo-Castel, 1991), el desarrollo vegetativo de explantos de patata (Ravnikar et al., 1992), favorecen el aumento de la cantidad de raíces y el peso del sistema radical (Martínez, 1996), y también la formación de raíces adventicias (Zhang et al., 1982; Yoon et al., 2009).

Además, los jasmonatos activan mecanismos de defensa de los vegetales en respuesta a estreses medioambientales como sequía, baja temperatura y salinidad (Wasternack, 2007).

En tomate, *Lycopersicon esculentum* cv. *Pera*, cultivar tolerante a la salinidad, los niveles endógenos de jasmonatos fueron mayores que los observados en el cultivar menos tolerante HF (Pedranzani et al., 2003). Sin embargo, en el cultivar *Pera*, los niveles endógenos de jasmonatos disminuyeron después de 6 horas de exposición al estrés salino y a las 72 horas los niveles de jasmonatos se equipararon a los del tratamiento control; indicando así que estos compuestos están involucrados en la percepción de este estrés abiótico (Pedranzani et al., 2003). El metil jasmonato ha sido identificado como un regulador que media entre diversos procesos de desarrollo de la planta que se desencadenan como respuesta de defensa ante condiciones de estrés biótico y abiótico. Su aplicación exógena produce efectos variados sobre las plantas, algunos semejantes a los producidos por el ácido abscísico (ABA), entre ellos la disminución de la elongación de las raíces, la inhibición de la germinación, la biosíntesis de etileno, la senescencia y abscisión de hojas y el cierre de estomas (Abdala et al., 2003; Gómez, 2005; Acosta y Farmer, 2010). El metil jasmonato es un compuesto volátil que también participa en la comunicación inter-plantas (Cheong y Choi, 2003). Estudios recientes han demostrado que el ácido jasmónico también está relacionado con las respuestas al estrés, ya que sus niveles incrementan en respuesta a estímulos externos como heridas, daños mecánicos, ataque de patógenos y estrés osmótico (Cheong y Choi, 2003; Yoon et al., 2009; Rai et al., 2011).

El conocimiento de los efectos de la aplicación exógena de metil jasmonato en las plantas es aún limitado y se ha relacionado repetidamente con diferentes situaciones de estrés, tales como el estrés hídrico, el ataque por patógenos y herbívoros; sin embargo, existe poca información que lo relacione con la tolerancia a la salinidad, bien sea en plantas enteras o en sistemas de cultivo *in vitro*.

Algunos estudios demuestran el efecto de los jasmonatos sobre el aumento de la tolerancia al estrés salino de las plantas, potenciando procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares relacionados (Pedranzani et al., 2003; Kang et al., 2005; Yoon et al., 2009). El objetivo principal de esta investigación es determinar el posible efecto protector del metil jasmonato en cuatro cultivares de patata de diferente ciclo de maduración, frente al estrés salino.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

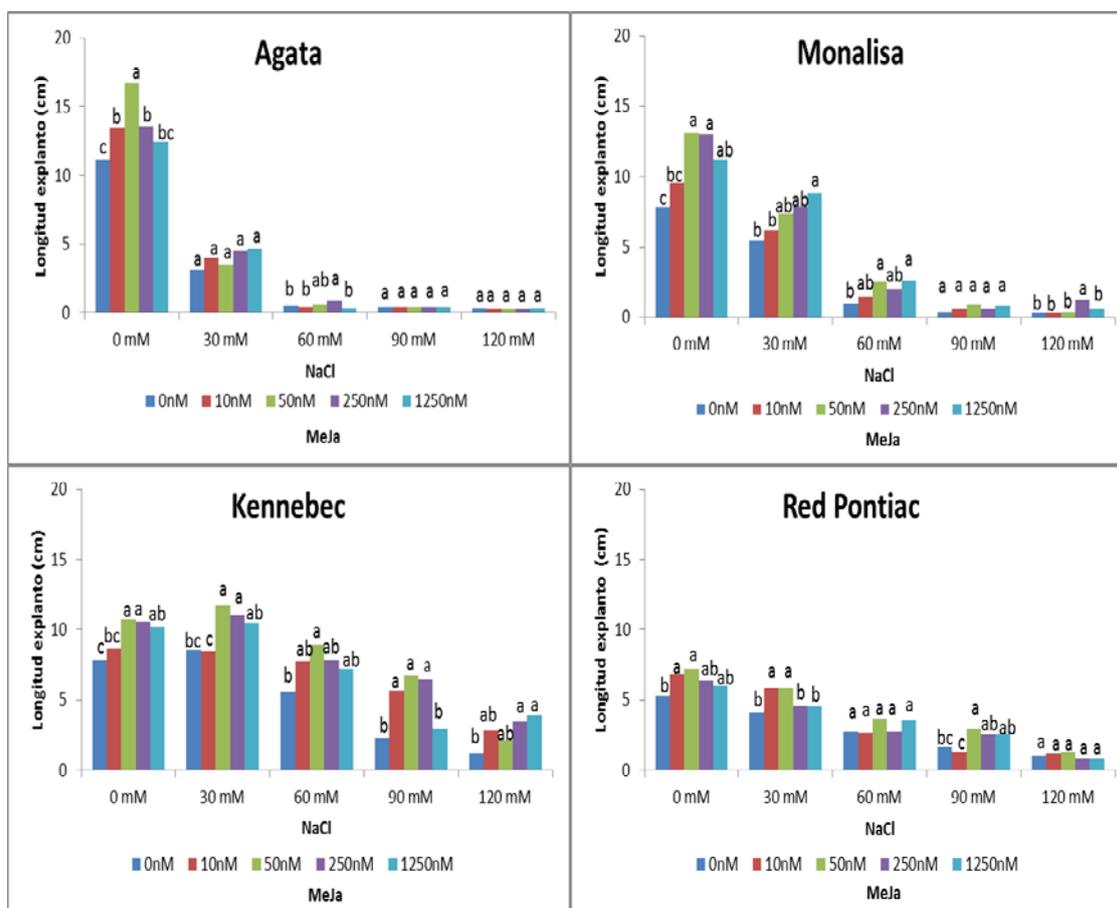
Para el desarrollo de este ensayo se utilizó la metodología descrita en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, variando únicamente en la adición de las concentraciones de NaCl y MeJa. Un total de 20 secciones nodales de los cultivares, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac se cultivaron en medio MS con 3% sacarosa, pH ajustado a 5,7-5,8; al cual se adicionó 0, 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa y las 5 concentraciones de NaCl 0, 30, 60, 90 y 120mM. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado en gradillas plásticas.

La evaluación del posible efecto protector del MeJa frente al estrés salino se realizó analizando el desarrollo vegetativo y radical de los 20 explantos de cada tratamiento y registrando las siguientes variables al final de cuatro semanas de cultivo:

La longitud de explanto y del sistema radical se registró utilizando una regla milimétrica. La cantidad de raíces, se determinó de forma visual en base a una escala establecida de 0 a 4 de acuerdo al número de raíces: 0 = ninguna, 1= 1-3 raíces, 2= 4-6 raíces, 3= 7-10 raíces y 4= más de 10 raíces. El peso fresco y seco de los explantos (incluye raíz - tallo - hojas) y el peso seco de hojas y raíces, se registraron utilizando una balanza de precisión de $1\pm 0,1$ mg. El área foliar de los explantos, se determinó utilizando el medidor de área foliar (mm^2) AM-100 ADC.

El análisis estadístico se realizó por separado para cada cultivar y nivel de salinidad, determinando con ello el efecto de las aplicaciones de MeJa sobre cada uno de los parámetros analizados mediante un ANOVA. En su caso la separación de medias se obtuvo empleando el test de Tukey ($p < 0,05$) del paquete estadístico SAS versión 9.

6.3. RESULTADOS



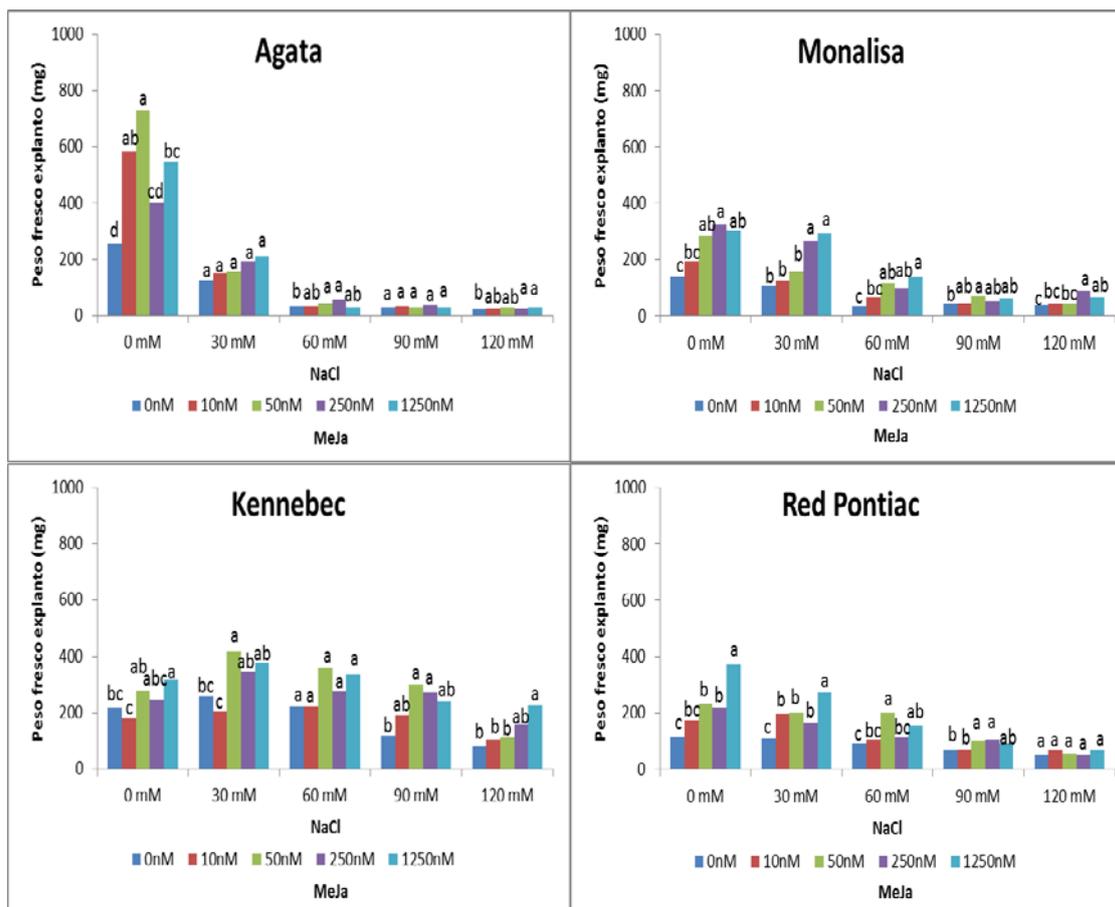
*Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 24. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

En el cultivar Agata la aplicación exógena de 10, 50 y 250 nM de MeJa incrementó significativamente la longitud de los explantos cuando estos se desarrollaron en ausencia de estrés salino (Figura 24). En los explantos expuestos a estrés salino de 30 mM de NaCl no se observó efecto significativo del MeJa sobre la longitud de los explantos, si bien se manifiesta una ligera tendencia a incrementar esta variable conforme se incrementa la concentración de MeJa. Aunque el aporte de 60 mM de NaCl apenas permite el crecimiento de los explantos, el MeJa mantiene un efecto similar, de forma que la concentración de 250 nM incrementó significativamente la longitud de los explantos respecto al control sin MeJa. Al incrementar el estrés salino a 90 y 120 mM el desarrollo de los explantos prácticamente cesa y no se observó efecto alguno del MeJa

sobre esta variable (Figura 24). En el cultivar Monalisa la aplicación de MeJa tuvo un efecto semejante al del cultivar Agata aunque más marcado e incrementando significativamente la longitud de los explantos cultivados en presencia o no de estrés salino. En ausencia de estrés salino la aplicación exógena de MeJa 50, 250 y 1250nM incrementó significativamente la longitud de los explantos. Un efecto similar se observó cuando los explantos fueron expuestos a un estrés salino de 30 y 60mM: la aplicación de MeJa entre 50 y 1250mM favoreció la elongación de los explantos. A concentraciones salinas de 90mM la aplicación de MeJa no presentó diferencias con el control. No obstante, la concentración de 250nM de MeJa incrementó significativamente la longitud de los explantos respecto al control sin MeJa cuando estos se cultivaron con 120mM de NaCl (Figura 24).

En el cultivar Kennebec, la aplicación exógena de MeJa incrementó la longitud de los explantos cultivados en ausencia de estrés salino, efecto que también se observó en los explantos cultivados en condiciones de estrés salino. En general, los explantos cultivados con las concentraciones de 50, 250 y 1250nM de MeJa presentaron una mayor longitud respecto al control sin MeJa y en todas las concentraciones salinas evaluadas (Figura 24). En el cultivar Red Pontiac la longitud de los explantos aumentó con la adición de 10 y 50nM de MeJa cuando los explantos fueron cultivados con 0, 30 y 90mM de NaCl. En las concentraciones de 60 y 120mM no se observaron diferencias significativas respecto al control pero, en el caso de 60mM de NaCl se observó una ligera tendencia a aumentar la longitud de los explantos con la adición de 50 y 1250nM de MeJa (Figura 24). El aumento de la longitud de los explantos del cultivar Red Pontiac cultivados con MeJa fue proporcionalmente menor que los observados en los otros tres cultivares evaluados (Figura 24).



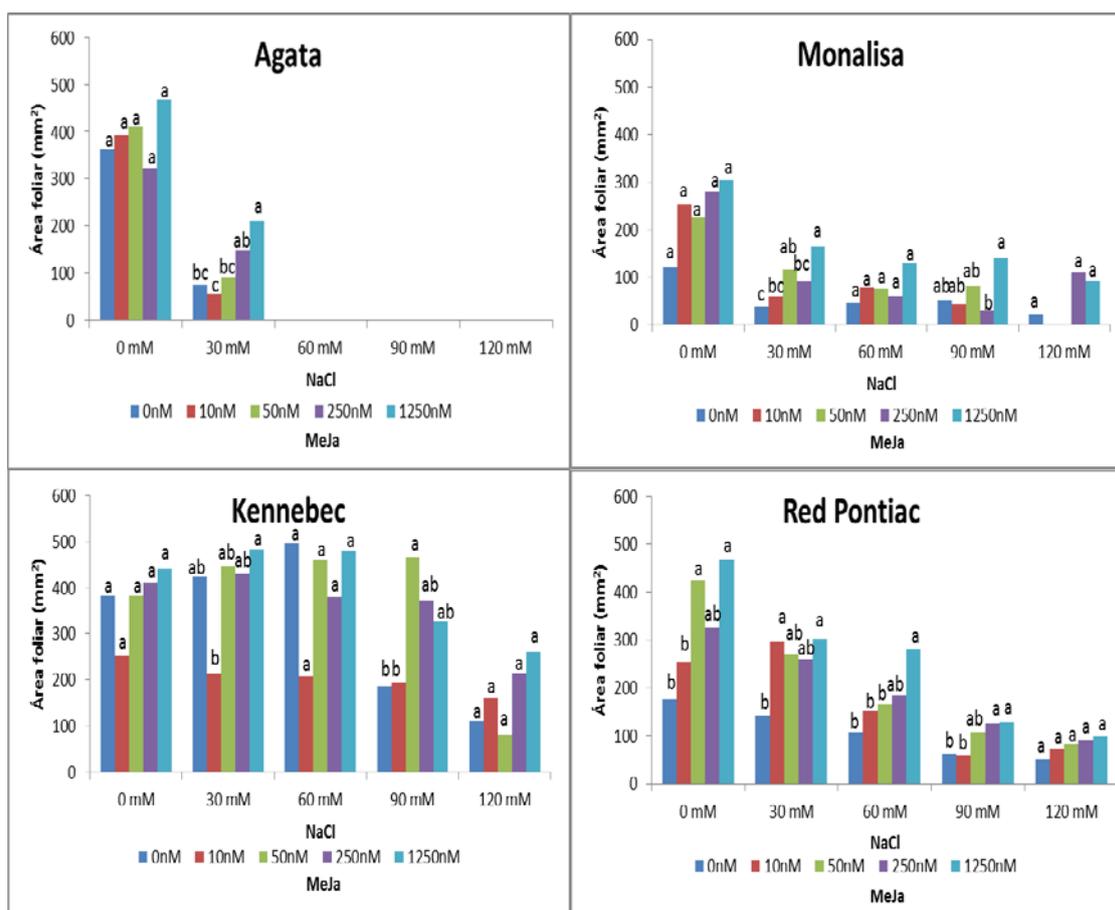
* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 25. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso fresco de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

En el cultivar Agata el peso fresco de los explantos se incrementó con la aplicación exógena de MeJa en ausencia de estrés salino. Al incrementar la concentración salina a 30mM no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo si se observó una tendencia a incrementar con el aumento de la concentración de MeJa en el medio de cultivo. En este cultivar, las concentraciones salinas superiores a 30mM afectaron drásticamente el desarrollo de los explantos, aun así, las concentraciones entre 50 y 1250nM de MeJa incrementaron el peso fresco de los explantos cultivados con un estrés salino de 60 y 120mM (Figura 25).

En el caso de Monalisa, cultivar clasificado como ligeramente más tolerante a la salinidad en el capítulo 5 de esta Tesis Doctoral, la aplicación exógena de MeJa incrementó significativamente el peso fresco de los explantos cuando estos se cultivaron con y sin estrés salino. En ausencia de estrés salino el peso fresco aumentó significativamente respecto al control con la adición de 50, 250 y 1250nM de MeJa.

En condiciones de estrés salino moderado, 30mM, la aplicación exógena de MeJa a concentraciones de 250 y 1250nM incrementó significativamente el peso fresco de los explantos. Al incrementar la salinidad a 60mM el peso fresco de los explantos aumentó significativamente con las concentraciones superiores a 10nM de MeJa. El peso fresco de los explantos, expuestos a 90mM de salinidad, aumentó significativamente con la concentración de 50nM de MeJa, mientras que con la concentración más alta de salinidad las concentraciones de 250 y 1250nM también incrementaron significativamente el peso fresco de los explantos (Figura 25). En el cultivar Kennebec las concentraciones de MeJa de 50nM o superiores aumentaron el peso fresco de los explantos cultivados en todas las concentraciones de NaCl ensayadas (Figura 25). En el cultivar Red Pontiac la aplicación exógena de MeJa incrementó el peso fresco de los explantos expuestos a concentraciones salinas de 0 a 90mM mientras que con la máxima concentración salina utilizada no se observaron diferencias entre las concentraciones de MeJa evaluadas (Figura 25). En ausencia de estrés salino el aporte de MeJa a partir de 50nM incrementó significativamente el peso fresco de los explantos y en los explantos expuestos a un estrés salino de 30mM este aumento se observó también a partir de la concentración mínima de MeJa ensayada.

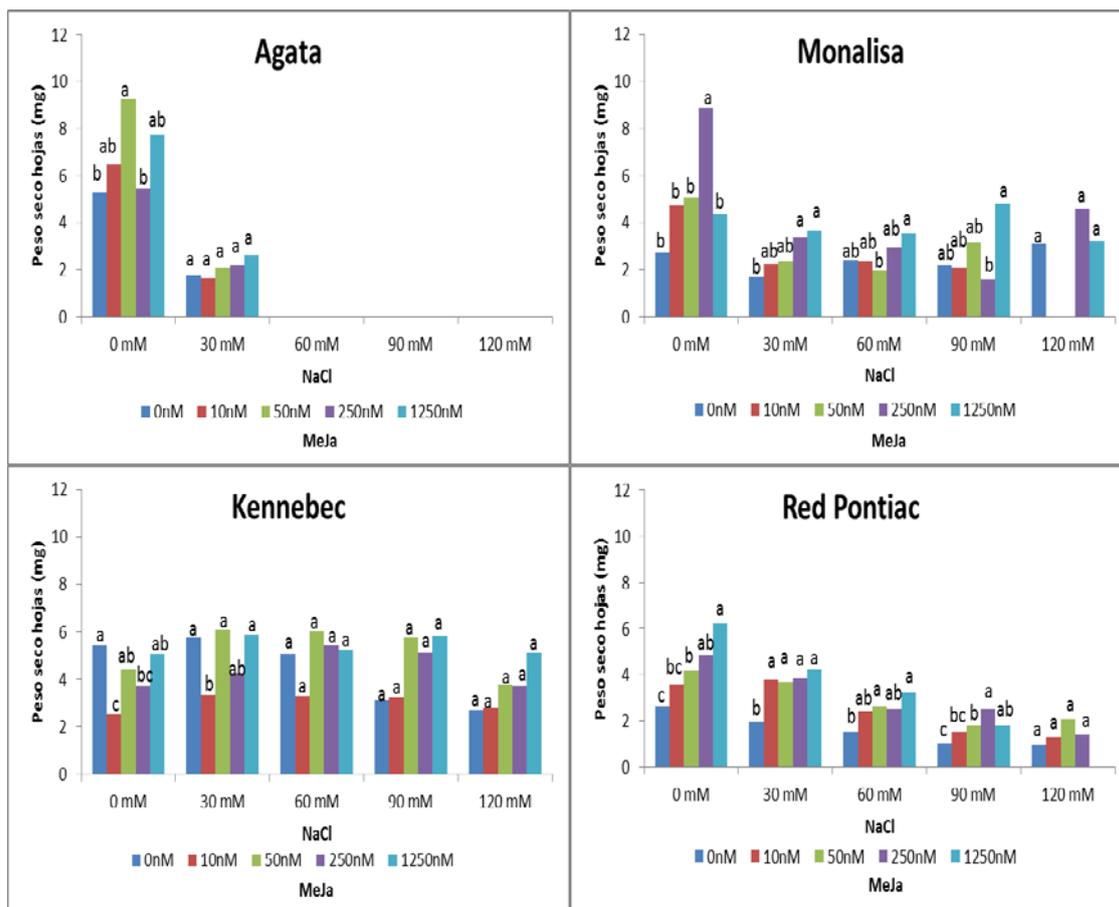


* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 26. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el área foliar de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

El área foliar de los explantos expuestos al estrés salino, en la mayoría de los casos aumentó con la aplicación exógena de MeJa. En el cultivar Agata sin salinidad no se encontraron diferencias significativas por el aporte de MeJa, aunque varias de las concentraciones produjeron valores superiores; en cambio cuando los explantos se cultivaron con un estrés salino de 30mM, el área foliar sí aumentó y significativamente con la concentración de 1250nM de MeJa (Figura 26). En el cultivar Monalisa se observó un efecto similar al de Agata, el área foliar de los explantos fue mayor con la aplicación prácticamente de cualquiera de las concentraciones de MeJa, aunque en la mayoría de los casos la mayor área foliar se obtuvo con la máxima concentración de MeJa y las diferencias en muchos casos no se pudo demostrar que fueran significativas (Figura 26).

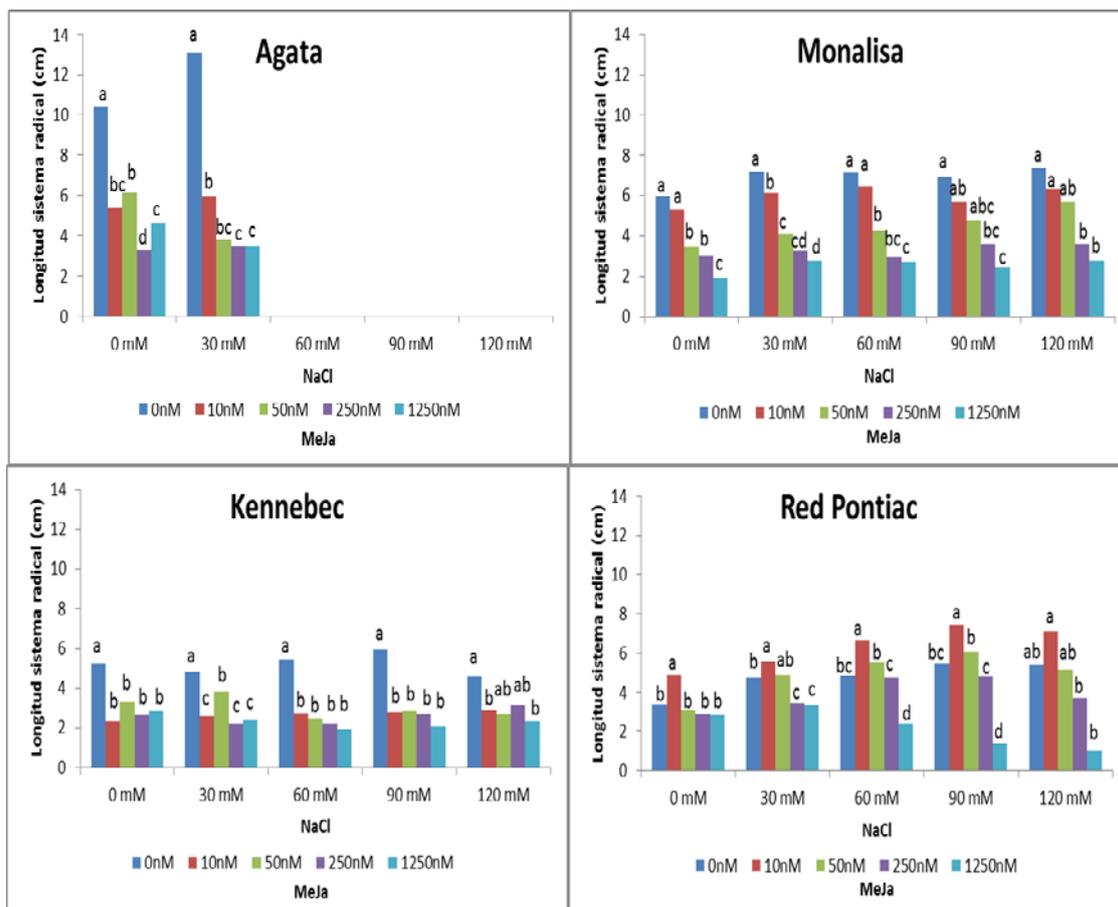
En el cultivar Kennebec la aplicación de 10nM de MeJa redujo el área foliar de los explantos cuando estos se cultivaron con 0, 30 y 60mM de NaCl. No obstante, las concentraciones entre 50 y 250nM de MeJa permitieron mantener valores del área foliar similares al control; en los explantos expuestos a 0, 30 y 120mM de salinidad la concentración máxima de MeJa, 1250nM, permitió alcanzar la mayor área foliar. Al incrementar el estrés salino a 90 y 120mM las concentraciones de MeJa superiores a 10nM incrementaron el área foliar de los explantos (Figura 26). En el cultivar Red Pontiac el área foliar de los explantos aumentó con la adición de MeJa; en los cultivados sin salinidad el área foliar aumentó significativamente con las concentraciones de 50 y 1250nM de MeJa. Al incrementar la salinidad a 30mM, el área foliar incrementó con todas las concentraciones de MeJa; este incremento fue significativo con las concentraciones de 10 y 1250nM. El área foliar de los explantos expuestos a una salinidad de 60mM incrementó significativamente con la concentración de 1250nM de MeJa, un efecto similar se observó en los explantos expuestos a 90mM de NaCl donde las concentraciones de 250 y 1250nM de MeJa incrementaron significativamente el área foliar de los explantos (Figura 26). Es importante destacar que la variación natural del tamaño de las hojas debido al estrés salino hace más difícil identificar diferencias significativas entre los tratamientos ensayados.



* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 27. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de las hojas de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

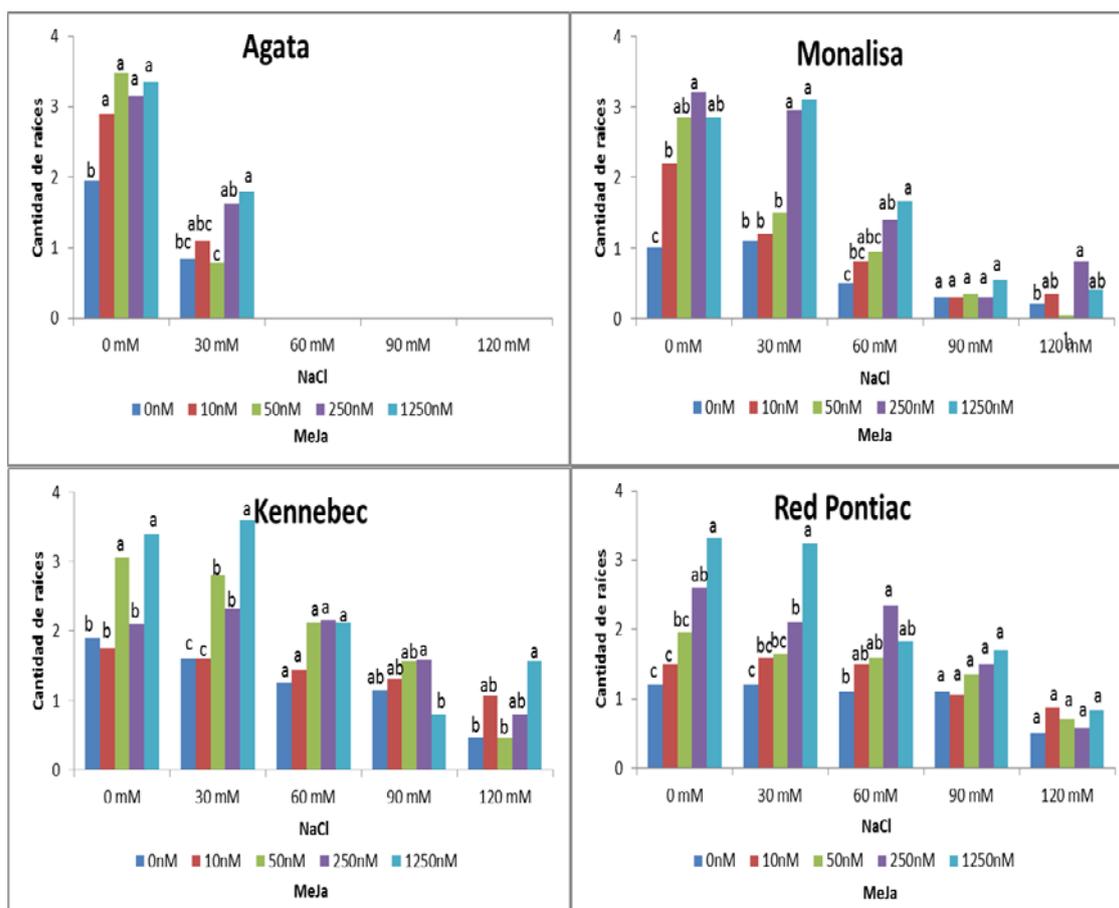
El peso seco de las hojas de los explantos de los cuatro cultivares presentó un efecto semejante al observado en la variable de área foliar. De esta forma se puede afirmar que las concentraciones de MeJa promueven el aumento del área foliar, respuesta que mostró ser independiente de la concentración salina (Figura 27). Por otra parte, en el peso seco de los tallos de los cuatro cultivares, ver anejos (Figura 33) también se observó que el estrés salino redujo el peso seco de los tallos, mientras que las concentraciones de MeJa, en la mayoría de los casos incrementaron el peso seco de los tallos especialmente cuando el desarrollo vegetativo y radical de los explantos no fue afectado por el estrés salino; al incrementar la salinidad el desarrollo de los explantos se redujo pero la adición de MeJa al medio de cultivo permitió incrementar ligeramente el peso seco de los tallos y en algunos casos de forma significativa.



* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 28. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la longitud del sistema radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

De forma general se observó que la adición de MeJa al medio de cultivo disminuyó la longitud del sistema radical de los explantos de los cultivares Agata, Monalisa y Kennebec cultivados en ausencia o presencia del estrés salino, mientras que en el cultivar Red Pontiac la concentración de MeJa de 10nM aumentó significativamente la longitud del sistema radical cuando los explantos se desarrollaron con o sin estrés salino (Figura 28). En todos los cultivares evaluados la concentración de 1250nM de MeJa fue la que redujo en mayor grado la longitud del sistema radical en las concentraciones salinas evaluadas de 30, 60, 90 y 120mM (Figura 28).



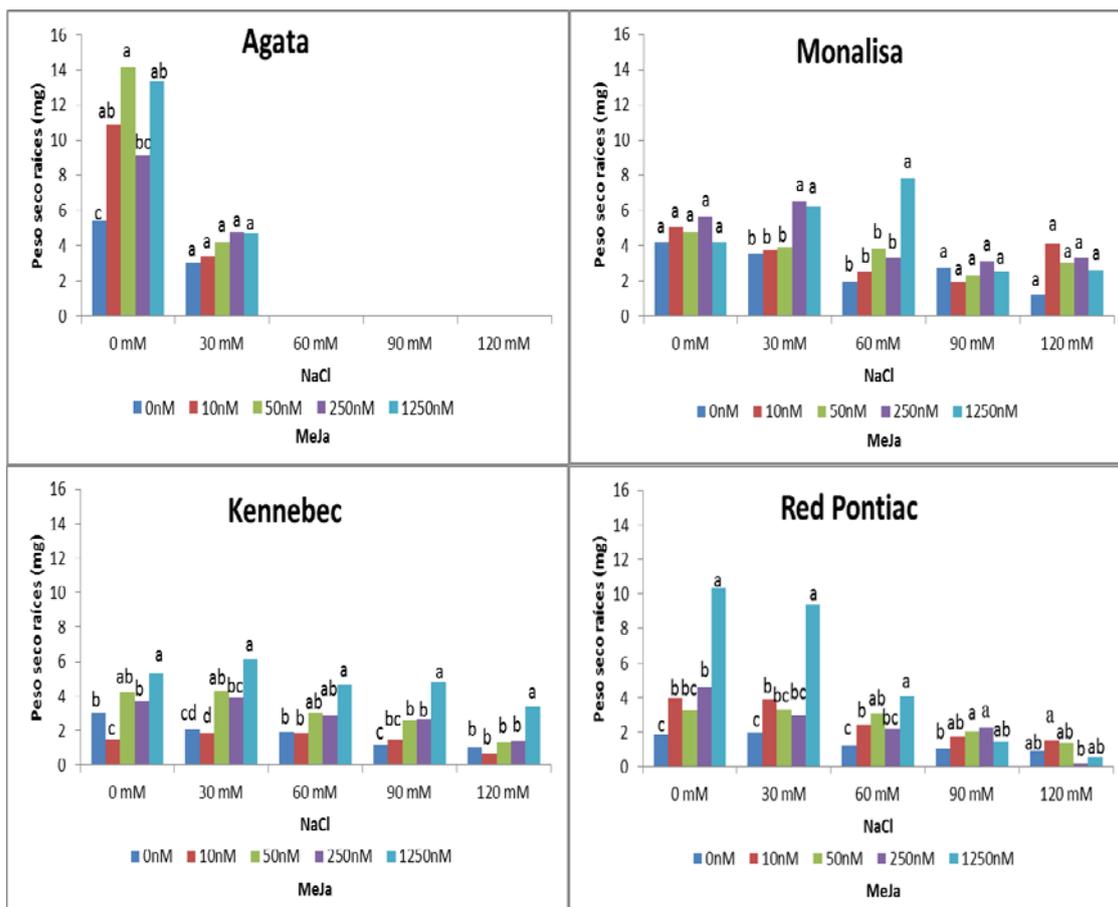
* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 29. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre la cantidad de raíces de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

De forma contraria a la longitud del sistema radical, la cantidad de raíces de los explantos de los cuatro cultivares aumentó con las concentraciones de MeJa, en la mayoría de los casos de forma significativa respecto al control (Figura 29). En el cultivar Agata sin salinidad, todas las concentraciones de MeJa incrementaron la cantidad de raíces; sin embargo, en los explantos cultivados con 30mM de NaCl, fueron solo las concentraciones de 250 y 1250nM de MeJa las que aumentaron la cantidad de raíces, de forma que con la concentración máxima de MeJa y 30mM de NaCl la cantidad de raíces fue similar a la del control cultivado en ausencia de salinidad y de MeJa (Figura 29). También en el cultivar Monalisa cultivado sin estrés salino, todas las concentraciones de MeJa aumentaron significativamente la cantidad de raíces; al incrementar la salinidad a 30 y 60mM se observó que la cantidad de raíces aumentó con

la adición de las concentraciones de MeJa incluso superando al control cultivado sin salinidad y sin MeJa (Figura 29).

En el cultivar Kennebec la cantidad de raíces de los explantos aumentó significativamente con la adición de 50 y 1250nM de MeJa en el medio de cultivo sin salinidad (Figura 29). Efecto similar se observó también en los explantos expuestos a 30 y 60mM de NaCl donde las concentraciones de MeJa superiores a 50nM aumentaron significativamente la cantidad de raíces y en el caso de 60mM de NaCl presentando valores similares a la de los explantos cultivados sin estrés y sin MeJa. La cantidad de raíces de los explantos expuestos a una salinidad de 90mM aumentó con las concentraciones de hasta 250nM de MeJa; la concentración máxima de MeJa evaluada redujo la cantidad de raíces respecto al control sin MeJa. En los explantos expuestos a la concentración salina máxima las concentraciones de MeJa evaluadas también incrementaron la cantidad de raíces (Figura 29). En el cultivar Red Pontiac la cantidad de raíces aumentó con las concentraciones de MeJa en todas las concentraciones salinas ensayadas (Figura 29). En los explantos cultivados en ausencia de salinidad y en los cultivados con 30 y 60mM de NaCl las concentraciones de MeJa tienden a aumentar progresivamente la cantidad de raíces, no obstante, este aumento fue superior con las concentraciones de 250 y 1250nM de MeJa. A concentraciones salinas mayores, 90 y 120mM el efecto fue similar pero en menor grado y sin presentar diferencias significativas. Cabe destacar que los explantos expuestos a un estrés salino de 90mM y con 50, 250 y 1250nM de MeJa presentaron una cantidad de raíces similar o incluso algo superior al control sin NaCl ni MeJa (Figura 29).



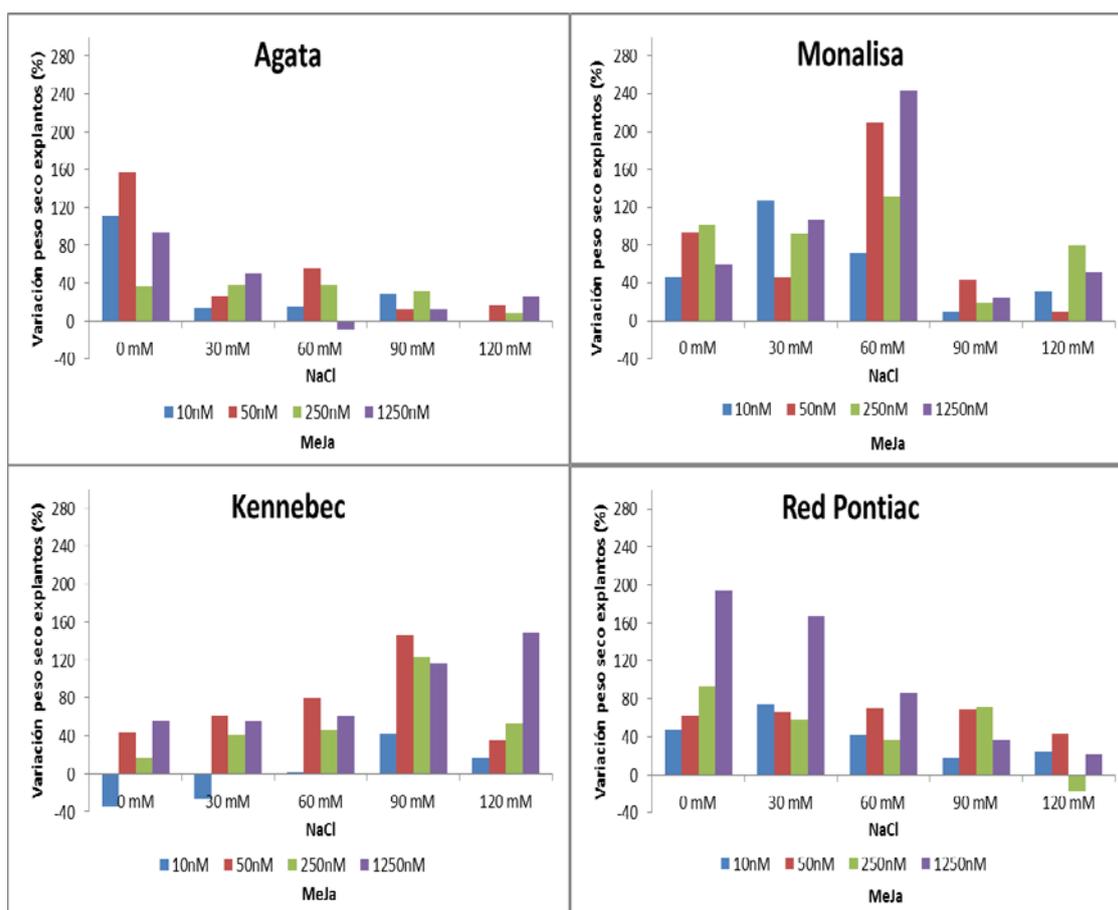
* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 30. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de raíces (mg) de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

El peso seco de las raíces está directamente relacionado con la masa radical total de los explantos, por lo cual es dependiente de la longitud del sistema radical, que tiende a reducirse por efecto del MeJa y de la cantidad de raíces que por el contrario tiende a aumentar por efecto del MeJa. Los resultados obtenidos demuestran que la adición de MeJa en el medio de cultivo incrementa el peso seco de las raíces de los cuatro cultivares evaluados (Figura 30). En el caso del cultivar Agata cultivado en ausencia de estrés salino el peso seco de las raíces aumentó significativamente con las concentraciones de 10, 50 y 1250nM. En este mismo cultivar pero expuesto a un estrés salino de 30mM no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de MeJa pero la tendencia observada fue que al aumentar la concentración de MeJa el peso seco de las raíces aumenta progresivamente (Figura 30).

A concentraciones salinas mayores de 30mM el desarrollo radical de los explantos se inhibió completamente (Figura 30). Sin embargo, en el cultivar Monalisa cultivado sin NaCl el peso seco de las raíces no presentó diferencias significativas entre las concentraciones de MeJa evaluadas (Figura 30); al incrementar la concentración salina a 30 y 60mM de NaCl el peso seco de las raíces aumentó con las concentraciones de MeJa, 250 y 1250nM (Figura 30). En las concentraciones de 90 y 120mM de NaCl no se observaron diferencias en el peso seco de las raíces entre las concentraciones de MeJa, no obstante, a 120mM de NaCl se observó que el peso seco de las raíces era siempre superior en todos los tratamientos con MeJa que en el control (Figura 30).

En el cultivar Kennebec el peso seco de las raíces se redujo significativamente con la concentración más baja de MeJa, sin embargo, a mayor concentración de MeJa el peso seco de las raíces aumentó y en varios casos de forma significativa (Figura 30). La concentración de 1250nM de MeJa fue la que permitió alcanzar el mayor incremento en el peso de las raíces en todas las concentraciones salinas evaluadas y con valores superiores al del control cultivado en ausencia de NaCl y MeJa (Figura 30). En Red Pontiac el peso seco de las raíces aumentó progresivamente con la concentración de MeJa del medio de cultivo sin salinidad; este efecto también se observó cuando los explantos se cultivaron con 30 y 60mM de NaCl, los cuales llegaron a superar el valor del control cultivado sin salinidad y sin MeJa. En las concentraciones salinas superiores, 90 y 120mM, también se observó el mismo efecto del MeJa sobre el peso de raíces, pero éste fue en menor grado debido al general efecto inhibitorio de la salinidad sobre el desarrollo de los explantos (Figura 30).



** Peso seco de explanto incluye (raíces - tallos - hojas).

Figura 31. Variación del porcentaje del peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados con 4 concentraciones de MeJa y expuestos a concentraciones de NaCl respecto tratamiento sin MeJa. Resultados corresponden al promedio de 20 explantos.

El peso seco de los explantos, que incluye raíces, tallos y hojas (ver anejos) mostró el mismo efecto que el observado en el análisis del peso fresco total de los explantos. Al realizar el análisis de la variación del porcentaje del peso seco para cada concentración salina respecto al control sin MeJa se observó que la aplicación exógena de las concentraciones de MeJa incrementó el porcentaje de peso seco de los explantos de los cultivares Agata, Monalisa y Red Pontiac expuestos a todas las concentraciones salinas ensayadas. El incremento del peso seco fue generalmente mayor cuanto mayor fue el aporte de MeJa al medio de cultivo hasta un aporte de 60mM de NaCl, notándose que a condiciones de estrés salino de 90 y 120mM el efecto disminuye, incluso drásticamente en el cultivar Monalisa, pero la variación del porcentaje del peso seco es siempre superior al control sin MeJa (Figura 31).

Por otra parte, en los explantos del cultivar Kennebec el peso seco de los explantos se redujo respecto al control cuando estuvieron expuestos a 0, 30 y 60mM de NaCl y 10nM de MeJa (Figura 31); al incrementar la concentración de MeJa por encima de 10nM el peso seco aumentó en todas las concentraciones de NaCl evaluadas. En este cultivar la variación del porcentaje del peso seco de los explantos expuestos a concentraciones salinas de 90 y 120mM fue superior al observado en el resto de los cultivares, que expuestos a estas concentraciones de NaCl siempre disminuyó (Figura 31).

6.4.-DISCUSIÓN

El cultivo de la patata es de gran importancia económica en la mayoría de países de mundo, principalmente debido a su contribución a la alimentación humana. La producción del tubérculo se ve limitada especialmente en las zonas áridas y semiáridas del planeta donde la salinidad es el factor limitante para la producción agrícola (Frusciante et al., 1999; Ashraf y Harris, 2004; Kim et al., 2008; FAO, 2014). La salinidad, sea causada por el contenido de sales en el suelo, por la irrigación con agua salina o por el uso excesivo de fertilizantes en la agricultura, es un factor limitante para la producción de los cultivos y puede llegar a provocar pérdidas en las cosechas superiores al 50% (Thakur et al., 2010; Mantri et al., 2012; Ahmad et al., 2012). No obstante, el efecto negativo de la salinidad, causada por la acumulación de iones Na^+ o por el estrés osmótico, sobre la fisiología de las plantas de patata es aún poco conocido, por lo cual se requiere profundizar en el conocimiento y buscar soluciones que permitan mitigar el estrés salino en este importante cultivo (Zhang y Donnelly, 1997; Backhausen et al., 2005; Shaterian et al., 2005 Aghaei et al., 2009).

Las plantas a lo largo del tiempo han evolucionado y han desarrollado diferentes mecanismos de defensa que les permiten hacer frente a situaciones de estrés (Fedina y Tsonev, 1997; Pozo et al., 2005; Wang et al., 2007; Yoon et al., 2009). Entre los mecanismos de defensa que poseen se encuentra la producción y acumulación de metabolitos secundarios (fenoles, fitoalexinas), la absorción, el transporte, la acumulación y la exclusión de iones perjudiciales asociados a la salinidad (Na^+), la producción y acumulación de compuestos osmoreguladores, como la prolina, el incremento de la actividad antioxidante (enzimas antioxidantes) y la regulación de la actividad fotosintética (apertura y cierre estomático), los cuales permiten mitigar en mayor o menor grado el estrés osmótico provocado por la salinidad (Martins et al., 2010; Del Amor y Cuadra-Crespo, 2010).

La activación de los mecanismos de defensa en las plantas, de forma natural, se produce exclusivamente en presencia del estrés. Sin embargo, se ha demostrado que pueden activarse los mecanismos de defensa mediante la aplicación exógena de compuestos denominados inductores o activadores, como el ácido jasmónico, el metil jasmonato, el ácido salicílico, los brasinosteroides, los polisacáridos o las poliaminas, entre otros.

Estos compuestos han demostrado tener la capacidad de inducir o activar las respuestas de defensa de las plantas ante situaciones de estrés biótico, abiótico o ambas (Fits y Memelink, 2000; Parida y Das, 2005; Hoque et al., 2007; Aghaei et al., 2009; Ahmad et al., 2010, 2012; Azzedine et al. 2011; Hasanuzzaman et al., 2011a, b; Hossain et al., 2011; Poór et al., 2011). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas respuestas de defensa son únicas y dependientes del genotipo de cada especie vegetal, incluso se han encontrado diferencias de respuesta entre cultivares (Chen et al., 1995; Robert-Seilaniantz et al., 2011). En este sentido, estudios previos demuestran que las aplicaciones exógenas de compuestos activadores de las defensas de las plantas, en concreto del MeJa, permiten mitigar los efectos negativos en las plantas expuestas a situaciones de estrés biótico y/o abiótico (Metodiev et al., 1996; Fedina y Tsonev, 1997; Walia et al., 2007; Sekmen et al., 2007; Aghaei et al., 2009; Del Amor y Cuadra-Crespo, 2010).

Otra de las respuestas que poseen las plantas ante el estrés salino es la selección en la absorción, traslocación y acumulación del ion Na^+ en sus tejidos. En este sentido, la tolerancia al estrés salino podría estar relacionada con la capacidad de absorción de los iones Na^+ y K^+ por parte de las raíces. El ion Na^+ compite con el K^+ por ingresar en la planta debido a que ambos cationes utilizan las mismas proteínas para ser transportados (Backhausen et al., 2005; Dionisio-Sese y Tobita, 2007; Aghaei, 2009). Bajo condiciones de estrés salino las concentraciones de K^+ disminuyen y las de Na^+ aumentan en raíces y tallos (Dionisio-Sese y Tobita, 2007). Los cultivares tolerantes tienen la capacidad de inmovilizar el Na^+ a nivel de vacuola o bien excluir este ion y así alcanzar un mayor desarrollo vegetativo y radical respecto a los cultivares sensibles (Rahnama y Ebrahimzadeh, 2004). No obstante, Aghaei et al. (2009) observaron en patata que las concentraciones endógenas de K^+ y Na^+ fueron similares en el cultivar tolerante Kennebec y en el sensible Concord cultivados *in vitro*, sugiriendo así que las concentraciones endógenas de Na^+ y K^+ no determinan si un cultivar es más o menos tolerante a la salinidad. Debido a la importancia del ion K^+ para los procesos fisiológicos, como la síntesis de proteínas, la activación enzimática, la síntesis del ATP, el ajuste osmótico y el transporte de azúcares, si no existiese absorción del ion K^+ los cultivares tolerantes no lograrían un desarrollo vegetativo y radical superior a los cultivares sensibles.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, sugieren que la tolerancia al estrés salino observada en los cultivares Kennebec y Red Pontiac posiblemente se debe a la capacidad innata de estos cultivares de inmovilizar o bien excluir el ion Na^+ de forma más eficiente que los cultivares menos tolerantes Agata y Monalisa, respuesta que en base a nuestros resultados puede estar mediada por el MeJa. Del Amor y Cuadra-Crespo (2010) demostraron en brócoli, *Brassica oleracea*, cultivado en condiciones controladas y expuesto a un estrés salino de 40mM de NaCl, que la aplicación exógena de 5mM de MeJa, concentración mucho más alta que las utilizadas en esta Tesis Doctoral, redujo significativamente los efectos negativos del estrés salino, encontrando también una menor absorción y acumulación del ion Na^+ en las hojas de plantas; sin embargo este efecto del MeJa no fue significativo cuando las plantas fueron expuestas a un nivel muy superior de salinidad, 120mM. Así mismo, plantas de cebada, *Hordeum vulgare*, pretratadas con ácido jasmónico, 12 μM , presentaron una menor concentración de Na^+ en las hojas respecto al control, sugiriendo así que la exclusión del ion Na^+ puede estar iniciada o potenciada por la aplicación exógena de MeJa (Walia et al., 2007).

Por otra parte, en arroz, *Oryza sativa*, expuestos a un estrés salino de 80mM de NaCl se observó que los cultivares sensibles acumularon mayor cantidad de Na^+ que los tolerantes; indicando que el sodio es más rápidamente transportado desde las raíces hacia los tallos en los cultivares sensibles que en los tolerantes (Kang et al., 2005). En las plantas glicofitas, la menor tolerancia a la salinidad está asociada a la incapacidad de eliminar o expulsar el Na^+ del citoplasma para proteger los procesos metabólicos (Parks et al., 2002). En este sentido, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan a los observados por Kang et al. (2005) respecto al papel protector de los jasmonatos aplicados de forma exógena frente al estrés salino y en concreto el MeJa.

La inducción y acumulación de compuestos osmoprotectores es otro de los mecanismos de defensa de las plantas para hacer frente a situaciones de estrés, especialmente aquellas relacionadas con el estrés osmótico. Este mecanismo está relacionado con el aminoácido prolina, el cual está involucrado en el ajuste osmótico entre el citoplasma y la vacuola (Sharp et al., 1988; Jyothsnakumari y Sudhakar 2003; Ali et al., 2007). Otras hipótesis sugieren que la prolina actúa como agente protector de las enzimas y estructuras intracelulares, actuando como un secuestrador de radicales libres o como compuesto de almacenamiento de carbono y nitrógeno para recuperar rápidamente los

tejidos del estrés (Ehsanpour y Fatahian, 2003). La acumulación de prolina ha sido observada en manzano, cerezo, banano y en hojas de colza expuestos al estrés salino (Huguet et al., 2003; Sotiropoulos 2007; Sivritepe et al., 2008; Mahmood, et al., 2012). El incremento en la actividad antioxidante también es un mecanismo de defensa que permite disminuir la acumulación de radicales libres tóxicos para la planta; es otra de las vías por la que las plantas muestran una mayor o menor tolerancia a situaciones de estrés. Este mecanismo está mediado por enzimas como la catalasa, la peroxidasa o la superóxido dismutasa, las cuales poseen la capacidad de degradar los compuestos tóxicos mediante la regulación de los niveles de peróxido de hidrógeno en las plantas (Aghaei et al., 2009).

Aghaei et al. (2009), observaron en la parte aérea de explantos cultivados *in vitro* del cultivar de patata Concord, sensible a la salinidad que la actividad de estas enzimas se redujo significativamente con el incremento de la salinidad hasta 90mM. No obstante, en las raíces de estos explantos una salinidad de 60mM aumentó la actividad de estas enzimas, y que descendieron a niveles equivalentes al de las raíces de los explantos control cuando la salinidad era mayor a 90mM de NaCl. De forma contraria, la actividad de la catalasa en tallos del cultivar tolerante a la salinidad Kennebec, no varió cuando se expuso a una concentración salina de 60mM. Al aumentar el estrés salino a 90mM la actividad de esta enzima se redujo significativamente respecto al control. En raíces la variación de esta enzima fue semejante a la del cultivar Concord. Resultados similares han sido publicados para remolacha, *Beta vulgaris*, y para arroz, *Oryza sativa* (Sekmen et al., 2007).

Adicionalmente, varios estudios demuestran el papel del MeJa como activador o inductor de respuestas de defensa frente al estrés salino, especialmente los relacionados con el aumento de la tasa fotosintética. La reducción de la tasa fotosintética es uno de los efectos fisiológicos negativos de la salinidad provocado básicamente por el cierre estomático (Wingler et al., 2000). En este sentido, Walia et al. (2007) demostraron que un pre tratamiento con 12 μ M de JA aumentó la conductancia estomática en plantas de cebada, *Hordeum vulgare*, expuestas a 40mM de NaCl. Fedina y Tsonev (1997) observaron un efecto similar en plantas de guisante, *Pisum sativum*, pre-tratadas con 100mM de MeJa y expuestas a 30mM de NaCl. Sin embargo, el efecto del JA sobre la conductancia estomática es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al ácido

jasmónico (Metodiev et al., 1996). Por otra parte, se ha demostrado que la aplicación exógena de MeJa, 12 μ M, indujo en hasta siete veces la expresión de genes relacionados con la Rubisco activasa y con la carbón anhidrasa respecto a las plantas control. La Rubisco activasa es importante para mantener una adecuada tasa fotosintética bajo situaciones de estrés salino, mientras que la expresión de la carbón anhidrasa actúa con efecto “priming”, es decir, incrementando los niveles de las proteínas quinasas MAPK's que permiten a la planta responder más rápido y con mayor fuerza ante una situación de estrés salino (Walia et al., 2007). En este mismo sentido, estos autores identificaron que la expresión de genes como los de la arginina decarboxilasa y de la apoplasto invertasa está directamente asociada a la tolerancia a la salinidad y su expresión es mayor después de la aplicación de JA.

Nuestros resultados obtenidos *in vitro*, en los cuatro cultivares de patata expuestos a diferentes concentraciones de estrés salino, demuestran que la aplicación exógena de MeJa permite reducir los efectos negativos del estrés salino en el desarrollo de los explantos. La adición de MeJa 10, 50, 250 y 1250nM al medio de cultivo en combinación con los diferentes niveles de salinidad evaluados, 30, 60, 90 y 120mM, permitió que los explantos de los cuatro cultivares incrementaran su longitud, peso fresco, área foliar, peso seco y cantidad y peso de raíces. Estos resultados confirman estudios previos que demuestran que la aplicación exógena de MeJa permite minimizar los efectos del estrés abiótico, en este caso el salino. Kang et al. (2005) observaron que la aplicación exógena de 30 μ M de JA incrementó el desarrollo vegetativo (peso seco) de arroz *Oriza sativa*, expuesto a 40mM de NaCl; adicionalmente, observaron que los cultivares más tolerantes presentaron un mayor desarrollo y acumulación de JA que los sensibles. En banano, *Musa accuminata*, la aplicación exógena de MeJa a concentraciones entre 5 y 160 μ M permitió incrementar la tasa de proliferación, el vigor, el peso fresco, el contenido de agua, el contenido de prolina y reducir la pérdida de agua por hoja de los explantos expuestos a un estrés osmótico de 30g/l de poli etilenglicol (PEG); por otra parte, si se cultivaban en ausencia de estrés osmótico y con 40 μ M de MeJa el desarrollo era mayor que en los explantos control (Mahmood et al., 2012).

En el cultivar Agata, sensible a la salinidad, el desarrollo vegetativo y radical de los explantos expuestos a concentraciones salinas superiores a 30mM fue inhibido prácticamente en su totalidad. Sin embargo, cuando los explantos fueron expuestos a un estrés salino de 30mM, las concentraciones de MeJa entre 10 y 1250nM permitieron incrementar la longitud de los explantos, el peso fresco, el área foliar, el peso seco de las hojas, la cantidad de raíces, el peso seco de las raíces y el peso seco de los explantos respecto al control con dicha salinidad y sin MeJa. Como se mencionó anteriormente, la longitud del sistema radical se redujo significativamente con la adición MeJa 10nM, y se redujo aún más conforme aumentaba la concentración de MeJa, de forma contraria la concentración máxima de MeJa ensayada incrementó la cantidad de raíces de los explantos expuestos a 30mM de salinidad, alcanzado valores similares a los explantos del control sin salinidad y sin MeJa.

En el cultivar Monalisa, cultivar menos tolerante a la salinidad respecto al cultivar Kennebec, el desarrollo vegetativo y radical fue inhibido de forma muy importante cuando los explantos se cultivaron con un estrés salino superior a 60mM. La adición del MeJa en el medio de cultivo mostró un efecto importante sobre el aumento del desarrollo vegetativo y radical de los explantos; cuando fueron expuestos a un estrés salino de 30mM y en algunos casos a 60mM de NaCl las concentraciones 250 y 1250nM de MeJa incrementaron ligeramente la longitud del explanto y su peso fresco, mientras que este incremento fue más acusado sobre el área foliar, la cantidad de raíces y el peso seco de los explantos. Estos valores fueron superiores a los observados en el control sin salinidad ni MeJa. De esta forma se demuestra el efecto del MeJa en el aumento del desarrollo vegetativo y radical de los explantos así como también su efecto protector frente al estrés salino.

En el cultivar Kennebec, tolerante al estrés salino, también se observó el efecto negativo de la salinidad pero en mucho menor grado que en el resto de los cultivares evaluados y en particular que en Agata y Red Pontiac. En este cultivar la adición de 30 a 60mM de NaCl en ausencia de MeJa permitió obtener explantos con un desarrollo similar al de los explantos control sin salinidad en buena parte de los parámetros determinados. El aumento de las concentraciones salinas hasta 120mM redujo la cantidad de raíces en este cultivar.

Por otra parte, la adición de MeJa permitió que los explantos expuestos a las diferentes concentraciones salinas aumentasen su desarrollo; no obstante, la aplicación de MeJa sí redujo la longitud del sistema radical de los explantos. Bajo un estrés salino de hasta 90mM, la adición de 50, 250 y 1250nM de MeJa permitió obtener explantos con un mayor desarrollo vegetativo y cantidad de raíces, aunque más cortas, y similar en muchos aspectos superior al observado en los explantos control cultivados en ausencia de NaCl y MeJa.

En el cultivar Red Pontiac, tolerante al estrés salino pero en menor grado que el cultivar Kennebec, los efectos negativos de la salinidad hasta 120mM fueron mitigados con la adición MeJa, permitiendo que los explantos alcanzaran un mayor desarrollo general que sin MeJa. El peso fresco de los explantos de este cultivar aumentó, de forma general, con la adición de MeJa al medio de cultivo, sin embargo, este aumento fue proporcionalmente menor que el observado en los otros tres cultivares. La longitud del sistema radical, nuevamente, no aumentó con la aplicación exógena de MeJa, no obstante bajo un estrés salino de 90mM las concentraciones de 50, 250 y 1250nM de MeJa incrementaron la cantidad de raíces de los explantos mostrando valores similares e incluso algo superiores al control sin salinidad y sin MeJa.

Los resultados obtenidos en este capítulo confirman el efecto negativo del estrés salino sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares obtenidos en el capítulo 5 de esta Tesis Doctoral. La mayoría de los parámetros analizados disminuyeron con el aumento de la concentración salina de 30 a 120mM. Por otra parte, también se confirmó el efecto positivo de la aplicación exógena de MeJa sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de patata observado en el capítulo 4 de esta Tesis Doctoral, efecto que también se observó aun cuando los explantos fueron expuestos a las diferentes concentraciones salinas ensayadas. Al incrementar la salinidad el área foliar y desarrollo vegetativo de los explantos se redujo, mientras que la adición de MeJa permitió obtener un área foliar superior de los explantos cuando se cultivaron con y sin salinidad. Bajo condiciones de estrés salino las concentraciones de MeJa permitieron incrementar el desarrollo de los explantos en general, aunque redujeron la longitud del sistema radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata evaluadas, sin embargo el peso seco de las raíces de los explantos se incrementó con la adición de MeJa, incremento que se debe a las concentraciones de

MeJa que aumentó de la cantidad de raíces en los explantos de los cuatro cultivares de patata. Asimismo, los cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac expuestos a estrés salino y con concentraciones entre 50 y 1250nM de MeJa alcanzaron un desarrollo vegetativo y radical similar y en algunos casos superior al control cultivado en ausencia de MeJa y NaCl.

En base a investigaciones previas que demuestran que la aplicación de jasmonatos activa los mecanismos de defensa de las plantas, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral también muestran el efecto protector del MeJa frente al estrés salino, el cual sugiere estar mediado por la activación de los mecanismos de defensa de las plantas. La respuesta de los explantos a la aplicación exógena de MeJa al medio de cultivo se produjo de la misma forma en los cuatro cultivares analizados, por lo que aparentemente es independiente del cultivar, pero la magnitud de la respuesta frente al estrés salino si mostró ser dependiente del cultivar; los menos tolerantes alcanzaron un menor desarrollo que los más tolerantes.

Los efectos positivos del MeJa sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos cultivados con estrés salino se relacionan con la capacidad del MeJa en inducir o activar los mecanismos de defensa de las plantas demostrado en estudios previos (Fedina y Tsonev, 1997; Fits y Memelink, 2000; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). En este estudio el mayor desarrollo de los explantos expuestos a estrés salino se obtuvo con la aplicación exógena de MeJa a concentraciones de 50 a 1250nM. La concentración de 10nM en muchos de los casos no fue suficiente para mitigar los efectos perjudiciales del estrés salino, lo que indica que la respuesta es dependiente de la concentración. Es importante también resaltar que las concentraciones de MeJa a nivel nM utilizadas en esta Tesis Doctoral y que son eficaces para mitigar los efectos negativos de la salinidad son muy inferiores a las de las hormonas vegetales que se usan habitualmente en la agricultura.

Zhang et al. (2006) reportaron que concentraciones de JA entre 0,1 y 1 μ M incrementaron el desarrollo de los explantos mientras que concentraciones inferiores a 0,1 μ M no causaron efecto alguno. El mayor o menor desarrollo de los cultivares evaluados también dependió en gran parte de las características genóticas propias de

cada cultivar para hacer frente al estrés salino, lo cual demuestra que la tolerancia a la salinidad es dependiente del cultivar.

Así, en nuestro caso los explantos de los cultivares Agata y Monalisa presentaron un menor desarrollo que los cultivares Kennebec y Red Pontiac. Esta respuesta puede deberse, a que los cultivares más menos tolerantes a la salinidad, Agata y Monalisa, acumulan mayores niveles de iones perjudiciales en las hojas que los cultivares más tolerantes Kennebec y Red Pontiac, patrón de respuesta descrito previamente por Iwama, (1998) y Shaterian et al., (2005).

Finalmente, el ensayo que hemos realizado muestra la eficacia del cultivo *in vitro* para la selección de cultivares de patata que presentan tolerancia a la salinidad, adicionalmente, mediante esta técnica también es posible evaluar la eficacia de compuestos inductores o activadores del sistema de defensa de las plantas de forma rápida y fiable.

6.5. CONCLUSIONES

- El MeJa posee un efecto protector frente al estrés salino en cultivares de patata cultivados *in vitro*.
- La aplicación exógena de MeJa hace que el desarrollo vegetativo y radical de los explantos expuestos al estrés salino disminuya en menor proporción o incluso que aumente respecto a los cultivados sin MeJa y con salinidad.
- La aplicación de MeJa al medio de cultivo incrementa la longitud de explanto, el peso fresco, área foliar, peso seco de hoja, peso seco de raíces, cantidad de raíces en la mayoría de los cultivares ensayados.
- La aplicación de MeJa redujo la longitud del sistema radical de los explantos en los cuatro cultivares de patata evaluados.
- Las concentraciones de MeJa que mejor permiten mitigar los efectos del estrés salino se sitúan entre 50 y 1250nM.
- La concentración de 10nM de MeJa es insuficiente para obtener un aumento en la tolerancia a la salinidad y en todas las variables evaluadas.

6.6. REFERENCIAS

Abdala, G; Miersch, O; Kramell, R; Vigliocco, A; Agostini, E; Forchetti, G y Alemano, S. 2003. Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Journal of Plant Growth Regulation* 40: 21-27.

Acosta, F. I y Farmer, E. 2010. Jasmonates. The Arabidopsis book 8: *American Society of Plant Biologist*. 1-13p.

Aghaei, K; Ehsanpour, A. A y Komatsu, S. 2009. Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(12): 1095-1103.

Ahmad, P; Jaleel, C. A; Salem, M. A; Nabi, G y Sharma, S. 2010. Roles of Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(3):161-175.

Ahmad, P; Hakeem, K, R; Kumar, A; Ashraf, M y Akram, N. A. 2012. Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). *African Journal of Biotechnology* 11: 2694-2703.

Ali, M. B; Hahn, E. J y Paek, K. Y. 2007. Methyl Jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules* 12: 607-621.

Ashraf, M y Harris, P: J. C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166: 3-16.

Azzedine, F; Gherroucha, H y Baka, M. 2011. Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 7: 27-37.

Backhausen, J. E; Klein, M; Klocke, M; Jung, S y Scheibe, R. 2005. Salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée) plants depends on light intensity and air humidity. *Plant Science* 169(1): 229-237.

Chen, Z; Malamy, J; Henning, J; Conrath, U; Sánchez-Casas, P; Silva, H y Klessig, D. K. 1995. Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(10): 4134-4137.

Cheong, J y Choi, Y. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* 19: 409-413.

- Creelman, R y Mullet, J. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- Del Amor, F. M y Cuadra-Crespo, P. 2010. Alleviation of salinity stress in broccoli using foliar urea or methyl-jasmonate: analysis of growth, gas exchange, and isotope composition. *Plant Growth Regulation* 63(1): 55-62.
- Dionisio-Sese, M, L y Tobita, S. 2007. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.
- Donnelly, D; Coleman, W y Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research* 80: 103-115.
- Ehsanpour, A. A y Fatahian, N. 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 53-56.
- Elkhatib, H. A; Elkhatib, E. A; Khalaf-Allah, A. M y Sharkawy, A. M. 2004. Salt tolerance of four potato cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 27: 1575-1583.
- FAO, 2014. *FAOSTAT. Estadísticas de cultivos por países*. [En línea] www.fao.org [Último acceso: 2 01 2014].
- Fedina, I. S y Tsonev, T. D. 1997. Effect of pretreatment with methyl jasmonate on the response of *Pisum sativum* to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 151(6): 735-740.
- Fits, L y Memelink, J. 2000. ORCA3, a Jasmonate-Responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289-295.
- Frusciante, L; Barone, A; Carputo, D y Ranalli, P. 1999. Breeding and physiological aspects of potato cultivation in the Mediterranean region. *Potato Research* 42: 265-277.
- Gómez, S. 2005. Micropropagación de *Solanum tuberosum* L. bajo condiciones de estrés salino, efecto del ácido jasmónico frente a dicho estrés y microtuberización mediante ácido acético. Proyecto Final de Carrera. *Universidad de Lleida. Departamento de Hortofruticultura Botánica y Jardinería*. 132p.
- Hasanuzzaman, M y Fujita, M. 2011a. Selenium pretreatment up regulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biology Trace Elements Research* 143: 1758-1776.

- Hasanuzzaman, M y Fujita, M. 2011b. Exogenous silicon treatment alleviates salinity-induced damage in *Brassica napus* L. seedlings by up-regulating the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system. Poster. *Abstract of Plant Biology* 2011, American Society of Plant Biology.
- Hoque, M, A; Banu, M. N. A; Okuma, E, Amako, K; Nakamura, K; Shimoishi, Y y Murata, Y. 2007. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology* 164: 1457-1468.
- Hossain, M. A; Munemasa, S; Uraji, M; Nakamura, Y; Mori, I. C y Murata, Y. 2011. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156: 430-438.
- Huguet, R. V; Sulpice, R; Lefort, C; Maerskalck, V; Emery, N y Larher, F. R. 2003. The suppression of osmoinduced proline response of *Brassica napus* L. var *Oleifera* discs by polyunsaturated fatty acids and methyl-jasmonate. *Plant Science* 164: 119-127.
- Iwama, K. 1998. Development of nodal and lateral roots in potato under field conditions. *Journal Fac-Agri. Hokkaido. University* 68: 33-44.
- Jyothsnakumari, G y Sudhakar, C. 2003. Effects of jasmonic acid on groundnut during early seedling growth. *Biologia Plantarum* 47: 453-456.
- Kang, D; Seo, Y; Lee, J; Ishii, R; Kim, K. U; Shin, D. H y Lee, I. 2005. Jasmonic Acid differentially affects growth, ion uptake and Abscisic Acid concentration in Salt-tolerant and Salt-sensitive rice cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* 191: 273-282.
- Kim, H. J; Fonseca, J. M; Choi, J. H; Kubota, C y Kwon, D. Y. 2008. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(10): 3772-3776.
- Mahmood, M; Bidabadi, S; Ghobadi, C y Gray, D. 2012. Effect of methyl jasmonate treatments on alleviation of polyethylene glycol-mediated water stress in banana (*Musa acuminata* cv. "Berangan", AAA) shoot tip cultures. *Plant Growth Regulation* 68: 161-169.
- Mantri, N; Patade, V; Penna, S; Ford, R y Pang, E. 2012. Abiotic stress responses in plants: present and future. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. Springer, New York, 1-19p.

- Martínez, M. 1996. La patata de siembra en España: desenvolvimiento productivo y comercial de un cultivo normalizado y controlado. *Ería* 39-40: 1 09-123.
- Martins, A; Souza, T. F; De, Jacinto, T; Lima, O y Machado, T. 2010. Effect of Methyl Jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Brasilian Society of Plant Physiology* 22(3): 151-158.
- Metodiev, M. V; Tsonev, T. D y Popova, L. P. 1996. Effect of jasmonic acid on the stomatal and nonstomatal limitation of leaf photosynthesis in barley leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* 15: 75-80.
- Munns, R y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Parida, A y Das, A. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(3): 324-349.
- Parks, G. E; Dietrich, M. A y Schumaker, K. S. 2002. Increased vacuolar Na⁺ / H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany* 53(371): 1055-1065.
- Pedranzani, H; Racagni, G; Alemano, S; Miersch, O; Ramirez, I; Peña-Cortez, H; Taleisnik, E; Machado-Domenech, E y Abdala, G. 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation* 41: 149-158.
- Pelacho, A. M y Mingo-Castel, A. M. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured in vitro. *Plant Physiology* 97: 1253-1255.
- Poór, P; Gémes, K; Horváth, F; Szepesi, A; Simon, M. L y Tari, I. 2011. Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biology* 13: 105-114
- Pozo, M. J; Loon, L. C y Pieterse, C. M. J. 2005. Jasmonates - Signals in Plant-Microbe Interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23(3): 211-222.
- Rahnama, H y Ebrahimzadeh, H. 2004. The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli. *Acta Physiologia Plantarum* 26: 263-270.
- Rai, M, K; Kalia, R. K; Singh, R; Gangola, M. P y Dnawan, A. K. 2011. Developing stress tolerant plants throught in vitro selection. An overview. *Environmental Experimental Botany* 71: 89-98.

- Ramakrishna, A y Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11): 1720-31.
- Ravnikar, M; Vilhar, B y Gogala, N. 1992. Stimulatory effects of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation* 11: 29-33.
- Rao, M. V; Lee, H; Creelman, R. A; Mullet, J. E y Davis, K. R. 2000. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633-1646.
- Robert-Seilaniantz, A; Grant, M y Jones, J. D. G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49: 317-43.
- Sekmen, A. H; Turkana, I y Takiob, S. 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt- tolerant *Plantago maritime* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum* 131: 399-411.
- Sharp, R. E; Silk, W. K y Hsiao, T. C. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiology* 87: 50-57.
- Shaterian, J; Waterer, D; De Jong, H y Tanino, K. K. 2005. Differential stress responses to NaCl salt application in early- and latematuring diploid potato (*Solanum* sp.) clones. *Environmental Experimental Botany* 54: 202-212.
- Sivritepe, N; Erturk, U; Yerlikaya, C; Turkan, I; Bor, M y Ozdemir, F. 2008. Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. *Biologia Plantarum* 52(3): 573-576.
- Sotiropoulos, T. E. 2007. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. *Biologia Plantarum* 51: 177-180.
- Thakur, P; Kumar, S; Malik, J. A; Berger, J. D y Nayyar, H. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental Experimental Botany* 67: 429-443.
- Walia, H; Wilson, C; Condamine, P; Liu, X; Ismail, A. M y Close, T. J. 2007. Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. *Plant Cell Environment* 30: 410-421
- Wang, S; Bowman, L y Ding, M. 2007. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry* 107: 1261-1269.

Wasternack, C. 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annual Botany (Lond)* 100: 681-697.

Wasternack, C y Hause, B. 2002. Jasmonates and Octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72: 165-221.

Wingler, A; Lea, P. J; Quick, W. P y Leegood, R. C. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355: 1517-1529.

Yoon, J; Hamayun, M; Lee, S y Lee, I. 2009. Methyl jasmonate alleviating salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science Biotechnology* 12(2): 63-68.

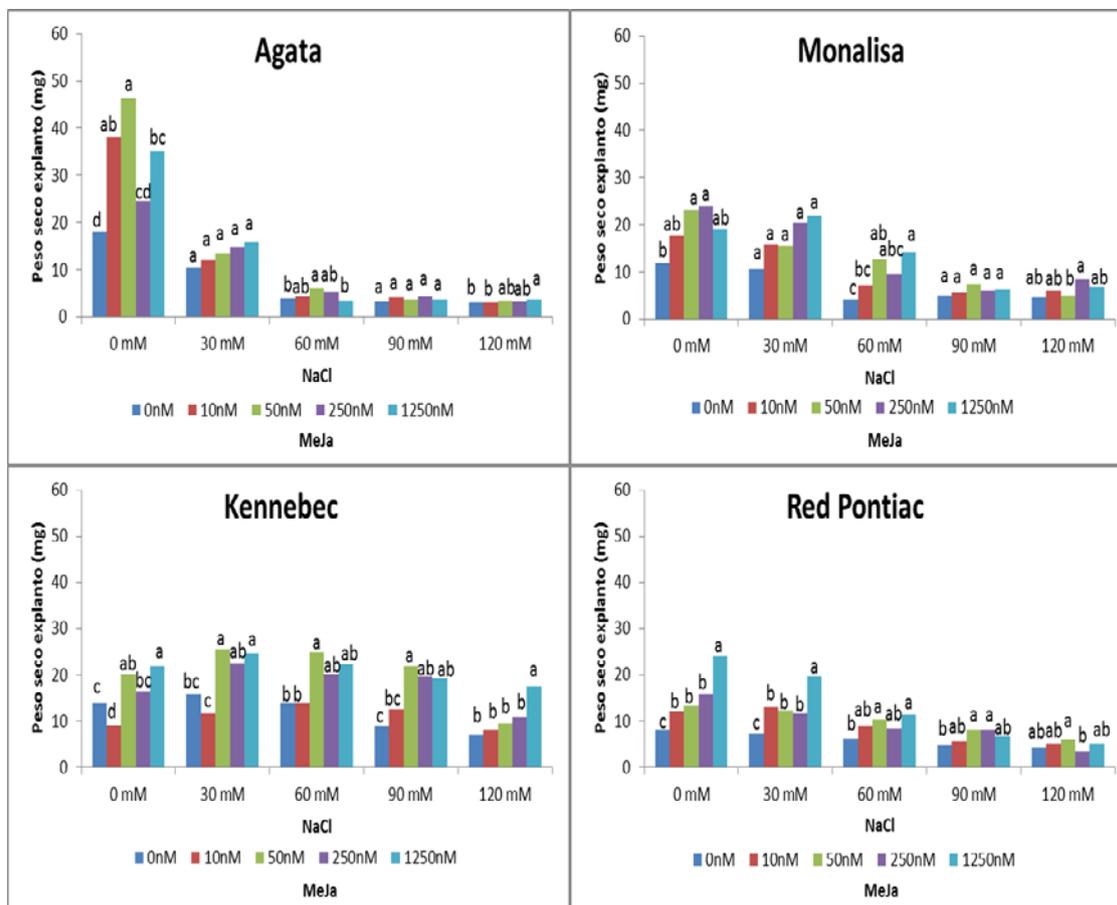
Zhang, H. Q; Croes, A y Linskens, H. 1982. Protein synthesis in germinating pollen of *Petunia*: Role of proline. *Planta* 154: 199-203.

Zhang, Z. J; Zhou, W. J; Li, H. Z; Zhang, G.Q; Subrahmanitan, K y Yu, Q. J. 2006. Effect of Jasmonic acid on in vitro explant growth and microtuberization in potato. *Biologia Plantarum* 50(3). 453-456.

Zhang, Y y Donnelly, D. 1997. In vitro bioassays for salinity tolerance screening of potato. *Potato Research* 40: 285-295.

6.7. ANEJOS

El peso seco de los explantos, de forma general, aumentó respecto al control con la adición de MeJa al medio de cultivo.



* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

** Peso seco de explanto incluye (raíces - tallos - hojas).

Figura 32. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

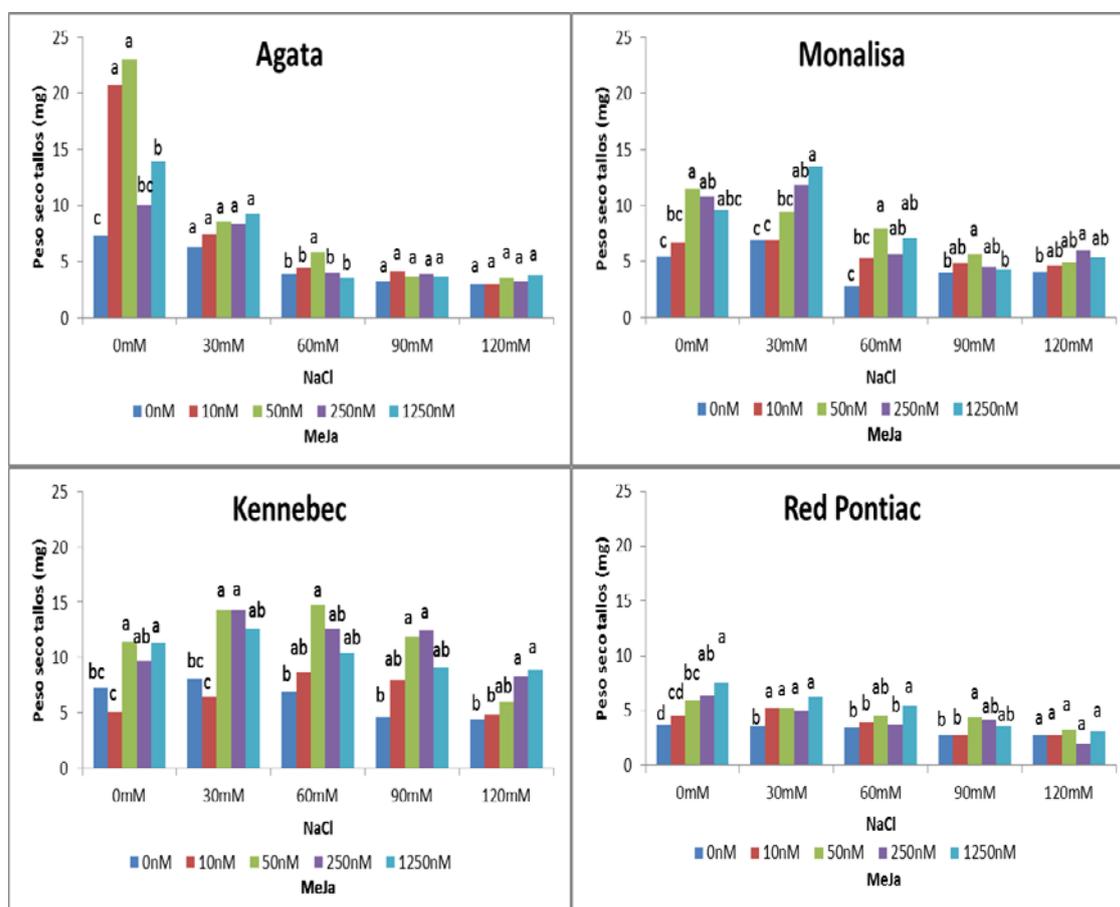
En el cultivar Agata cultivado sin NaCl las concentraciones de MeJa de 10, 50 y 1250 nM incrementaron significativamente el peso seco de los explantos (Figura 32). Al incrementar el estrés salino a 30 mM aunque también todas las concentraciones de MeJa incrementaron del peso seco de los explantos no se identificaron diferencias significativas.

Con concentraciones salinas de 60mM, el peso seco de los explantos aumentó significativamente con 50nM de MeJa, con 90mM de NaCl no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de MeJa y finalmente con 120mM de salinidad el peso seco de los explantos aumentó con la concentración máxima de MeJa. Es necesario destacar que concentraciones de NaCl superiores a 30mM inhibieron casi en su totalidad el desarrollo de los explantos (Figura 32).

En el cultivar Monalisa las concentraciones de MeJa permitieron aumentar el peso seco de los explantos cultivados con o sin estrés salino. En ausencia de NaCl se observó que el peso seco de los explantos aumentó con el aumento de la concentración de MeJa; este aumento fue significativamente mayor respecto al control con las concentraciones de 50 y 250nM de MeJa (Figura 32). En los explantos cultivados con una salinidad de 30 ó 60mM el peso seco aumentó cuando se añadió 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa, destacando que con las concentraciones más altas de MeJa, 250 y 1250nM, los valores de peso seco fueron similares al del tratamiento sin salinidad y sin MeJa (Figura 32). Para las concentraciones salinas de 90 y 120mM se observó un ligero incremento del peso seco de los explantos debido a las concentraciones de MeJa, aunque sin diferencias significativas para 90mM de NaCl, mientras que para la salinidad de 120mM, la concentración de 250nM de MeJa aumentó significativamente el peso seco (Figura 32).

En el cultivar Kennebec el peso seco de los explantos se redujo con la aplicación de 10nM de MeJa cuando los explantos se cultivaron sin salinidad; al aumentar la concentración de MeJa hasta 1250nM aumentó respecto al control (Figura 32). Bajo condiciones de estrés salino 30mM concentraciones mayores de 10nM de MeJa incrementaron el peso seco de los explantos, especialmente con 50 y 1250nM de MeJa (Figura 32). A partir de un estrés salino superior a 30mM las concentraciones de MeJa 50, 250 y 1250nM permitieron incrementar el peso seco de los explantos, destacando que con el estrés salino máximo aplicado, 120mM, y la concentración máxima de MeJa los valores del peso seco fueron similares a los del control sin salinidad y sin MeJa (Figura 32). También en el cultivar Red Pontiac, el peso seco de los explantos cultivados con 0 y 30mM de NaCl se incrementó progresivamente con el aumento de las concentraciones de MeJa (Figura 32). Cuando los explantos se expusieron a concentraciones salinas de 60 y 90mM las concentraciones de MeJa superiores a 50nM incrementaron el peso seco de los explantos. No obstante, bajo un estrés salino de

120mM también se observó un ligero incremento del peso seco, especialmente con 1250nM de MeJa (Figura 32).



* Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 33. Efecto de las concentraciones de MeJa en el medio de cultivo sobre el peso seco de los tallos de los explantos de los cuatro cultivares de patata cultivados en concentraciones crecientes de salinidad. Resultados corresponden a la media de 20 explantos.

**7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROLINA EN
EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATADE
DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN EXPUESTOS AL ESTRÉS
SALINO Y AL METIL JASMONATO**

7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROLINA EN EXPLANTOS DE CUATRO CULTIVARES DE PATATA DE DIFERENTE CICLO DE MADURACIÓN EXPUESTOS AL ESTRÉS SALINO Y METIL JASMONATO

7.1. INTRODUCCIÓN

La prolina (PRO) es uno de los aminoácidos que forman parte de las proteínas de los seres vivos. Se trata del único aminoácido proteinogénico cuya α -amina es una amina secundaria en lugar de una amina primaria. La prolina en realidad es un iminoácido, pues su cadena lateral es cíclica y está compuesta por 3 unidades de metileno que quedan unidos al carbono alfa y al grupo amino, el cual pasa a llamarse imino. La prolina se forma directamente a partir de la cadena pentacarbonada del ácido glutámico, y por tanto no es un aminoácido esencial; es una molécula hidrófoba de masa molar 115,13 g/mol (Figura 34).

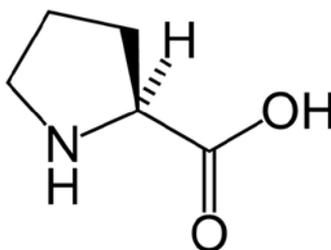


Figura 34. Estructura química de la prolina.

En el reino vegetal se han descrito dos rutas de síntesis para la prolina, la una a través de la ruta del glutamato y la otra ruta a partir de la ornitina (Orn), la cual puede ser trasaminada a pirrolina-5-carboxilato por acción de la Orn- δ -aminotransferasa (Hu et al., 1992).

La prolina en el citosol y cloroplasto de las plantas es sintetizada principalmente a partir del glutamato, el cual es reducido a glutamato semialdheido (GSA) por la enzima pirrolina-5-carboxilasa sintetasa P5CS, la cual convierte el glutamato a pirrolina-5-carboxilato (P5C). A continuación la pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) reduce la pirrolina-5-carboxilato a prolina (PRO) (Verbruggen y Hermans, 2008). Bajo condiciones de estrés salino la P5CS acumulada en los cloroplastos, potencia la biosíntesis de la prolina en los plástidos. La degradación de la prolina ocurre en la mitocondria, donde es oxidada a P5C y glutamato mediante la acción secuencial de la prolina deshidrogenasa (PDH) y de la pirrolina-5-carboxilasa deshidrogenasa (P5CDH)

(Verbruggen y Hermans, 2008; Szabados y Savouré, 2009). Otra ruta de síntesis de la prolina se produce a partir de la ornitina, la cual es transaminada por la ornitina-delta-aminotransferasa produciendo glutamato semialdehído y pirrolina-5-carboxilato, el cual es finalmente convertido a prolina (Ribarits et al., 2007; Verbruggen y Hermans, 2008; Szabados y Savouré, 2009).

Bajo condiciones de estrés las plantas tienen la capacidad de acumular prolina en sus órganos como mecanismo de respuesta adaptativa frente a condiciones adversas; se ha demostrado que la acumulación de prolina en plantas ocurre después de la exposición a la salinidad, sequía, altas y bajas temperaturas, infección de patógenos, anaerobiosis, deficiencias nutricionales, contaminación ambiental y radiación ultra violeta (Saradhi et al., 1995; Hare y Cress, 1997; Siripornadulsil et al., 2002). Sus niveles en tejidos vegetales ante una situación de estrés varían entre especies e incluso entre variedades, pudiendo llegar a ser 100 veces superiores a su nivel normal (Verbruggen y Hermans, 2008).

La acumulación de prolina no solo se ha reportado bajo condiciones de estrés, también se han detectado altos niveles de prolina en órganos reproductivos de plantas libres de estrés, donde posiblemente actúa como agente protector de la desecación, daños osmóticos y celulares durante la embriogénesis y en la formación de la semilla. En los órganos reproductivos de *Arabidopsis*, flores, polen, silicuas y semillas, el contenido de prolina libre representó un 26% del total de los aminoácidos libres evaluados, mientras que en los tejidos vegetativos únicamente fue entre el 1 y el 3% (Chiang y Dandekar, 1995). De forma semejante en flores de tomate, *Lycopersicon esculentum*, el contenido de prolina libre fue 60 veces superior al analizado en órganos vegetativos de la planta (Schwacke et al., 1999). Por otra parte, se ha demostrado que la prolina también actúa en varios procesos de desarrollo, como la elongación del tubo polínico (Zhang et al., 1982), o la elongación de pelos radicales en dicotiledóneas (White et al., 1985), y en la elongación de la raíz primaria en maíz, *Zea mays*, bajo estrés hídrico (Voetberg y Sharp, 1991; Hare y Cress, 1997; Spollen et al., 2008).

Teniendo en consideración la limitación que supone la salinidad para la agricultura mundial, es necesario profundizar en el conocimiento del papel que juega la prolina ante situaciones de estrés salino; altas concentraciones de sales en el suelo o agua de riego, o un déficit hídrico (sequía) causan un desequilibrio osmótico en las plantas que incrementa su contenido de prolina (Chiang y Dandekar, 1995). La salinidad y la sequía también provocan un estrés oxidativo que afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas. Ante esta situación, las plantas pueden desarrollar una respuesta adaptativa que está mediada por la acumulación de prolina en los tejidos, esta actúa como un osmolito compatible que permite mitigar los efectos del estrés oxidativo a nivel celular, estabilizando la actividad de enzimas oxidativas (Smirnoff y Cumbes, 1989; Hare y Cress, 1997). Líneas transgénicas de soja que contienen el gen $L.\Delta^1$ Pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR), con capacidad de sintetizar prolina, fueron comparadas con las líneas no transformadas y expuestas al estrés hídrico, observándose que en las líneas transgénicas el contenido de prolina fue mayor que en las no transformadas (De Ronde et al., 2004).

Los contenidos de prolina pueden ser indicadores para detectar sensibilidad a la salinidad y al frío, al menos así sucede en plantas mutantes de *Arabidopsis* que poseen el gen ESK1 que mejora la respuesta de aclimatación al frío, en las plantas mutantes a bajas temperaturas mostraron un mayor porcentaje de supervivencia y una cantidad de prolina superior a las plantas silvestres (Xin y Browse, 2008). En cultivares de patata cultivadas en invernadero y expuestas a 60mM de NaCl, el cultivar Mozart acumuló significativamente menos prolina que el cultivar Desiree, en este mismo estudio, el análisis de expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de la prolina P5CS1 y P5CR y el de degradación PDH mostró que en el cultivar Desiree la expresión del P5CS1 fue el doble respecto al cultivar Mozart mientras que la expresión de PDH se redujo entre 3 y 4 veces en los dos cultivares (Jaarma et al., 2013).

El objetivo de este experimento fue determinar el papel que juega la prolina bajo condiciones de estrés salino y como parámetro para evaluar la tolerancia o susceptibilidad de los cuatro cultivares de patata a la salinidad y el posible efecto protector del MeJa frente al estrés salino.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación del contenido de prolina se realizó en la parte vegetativa (hojas y tallos) de los explantos de los cultivares de patata, Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac cultivados durante 4 semanas en una cámara de cultivo a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y expuestos a la combinación de las concentraciones salinas de 0, 30, 60, 90 y 120mM y de 0, 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa.

El método seguido para la extracción y determinación de la prolina se basó en el propuesto por Bates et al. (1973). De cada tratamiento se pesaron, por triplicado, entre 0,1 y 0,25 gramos de material vegetal fresco, el cual se homogenizó con 5ml de una solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3% para obtener el extracto inicial. La solución se filtró y se hizo reaccionar 2ml del filtrado con 2ml de ácido acético glacial y con 2ml de una solución de ninhidrina, que se había preparado previamente disolviendo 1,25g de ninhidrina con 30ml de ácido acético glacial y 20ml de ácido fosfórico 6M. La mezcla del extracto más el ácido acético glacial y la solución de ninhidrina se mantuvo en baño maría a 100°C durante 1 hora, posteriormente se detuvo la reacción en baño con hielo. A continuación a los 6ml de la muestra se añadieron 4ml de tolueno puro, se agitó con un vórtex durante 15 segundos a 1100 rpm y se dejó en reposo durante 5 minutos. Se recuperó la fase orgánica (Tolueno) que contenía la prolina. Utilizando un espectrofotómetro se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 524nm, utilizando tolueno como blanco.

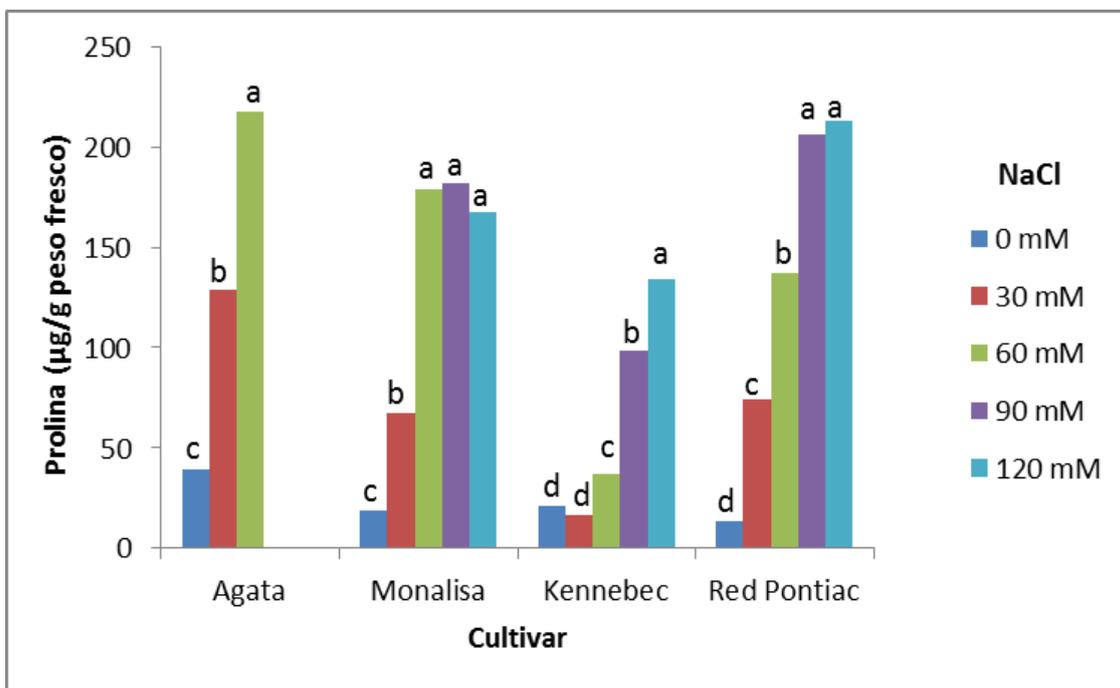
A partir de la realización de la correspondiente recta patrón se calculó el contenido de prolina sobre el peso fresco del material vegetal utilizando la siguiente fórmula (Bates et al., 1973).

$$\mu\text{moles prolina/g peso fresco material vegetal} = \frac{\mu\text{g prolina/ml} \times 4\text{ml de tolueno} \times \text{g de peso fresco}}{115,5\mu\text{g} / \mu\text{moles} \times 2,5}$$

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA para la variable prolina y en cada uno de los cultivares expuestos a los diferentes tratamientos de salinidad y MeJa, y en su caso la separación de medias se obtuvo empleando el test de Tukey ($p < 0,05$) del paquete estadístico SAS versión 9.

7.3. RESULTADOS

La aplicación de concentraciones crecientes de salinidad incrementó gradualmente el contenido de prolina en los explantos de los cuatro cultivares evaluados e independientemente de su ciclo de maduración (Figura 35).



*Letras diferentes en cada cultivar presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

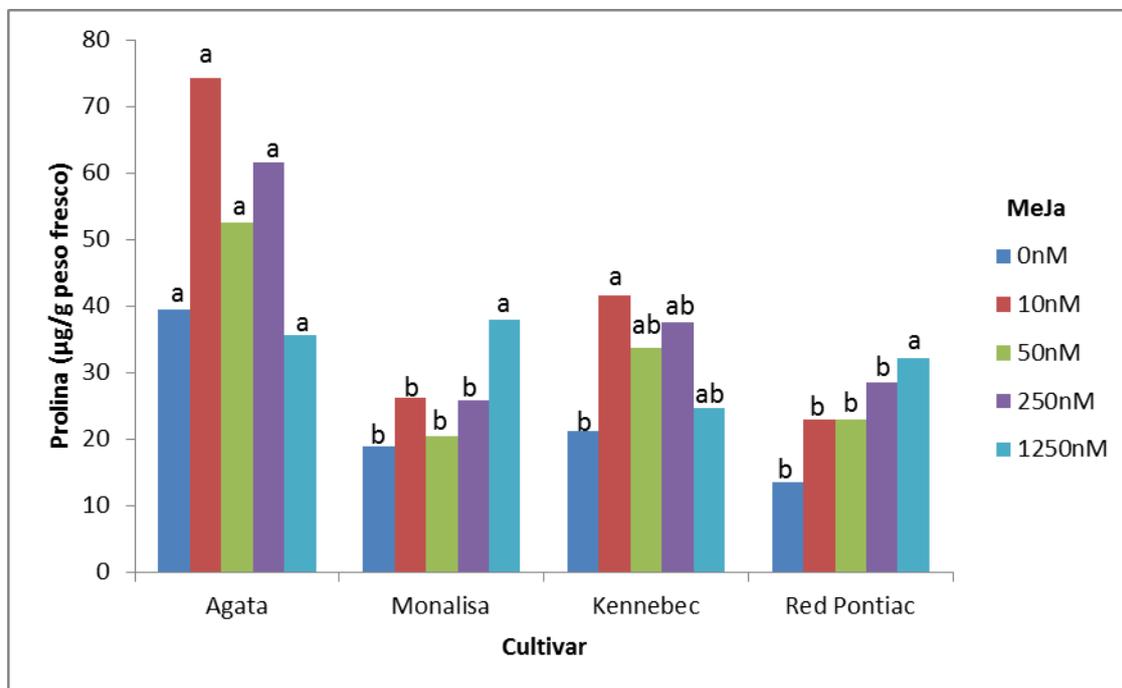
** El análisis de la prolina se realizó utilizando el tallo y las hojas de los explantos.

Figura 35. Contenido de prolina detectado en los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a concentraciones de NaCl. Resultados corresponden al promedio de tres repeticiones por tratamiento.

En el cultivar Agata el contenido de prolina aumentó significativamente un 225%, a la concentración de 30mM de NaCl, y un 470% con 60mM (Figura 35), a concentraciones superiores el desarrollo de los explantos se inhibió totalmente. De forma semejante, en el cultivar Monalisa la concentración salina de 30mM incrementó significativamente el contenido de prolina un 250%; a condiciones superiores de estrés salino la prolina llegó a aumentar hasta un 850% (Figura 35).

En el cultivar Kennebec un estrés salino de 30mM no afectó a la concentración de prolina. Con una concentración de 60mM de salinidad el contenido de prolina aumentó significativamente un 74%, sin embargo, en las concentraciones de 90 y 120Mm el contenido de prolina aumentó significativamente un 360 y 530% respectivamente

(Figura 35). En el cultivar Red Pontiac la prolina incrementó significativamente en todas las concentraciones salinas desde un 450% hasta aproximadamente un 1400% a la máxima concentración (Figura 35).



*Letras diferentes en cada cultivar presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

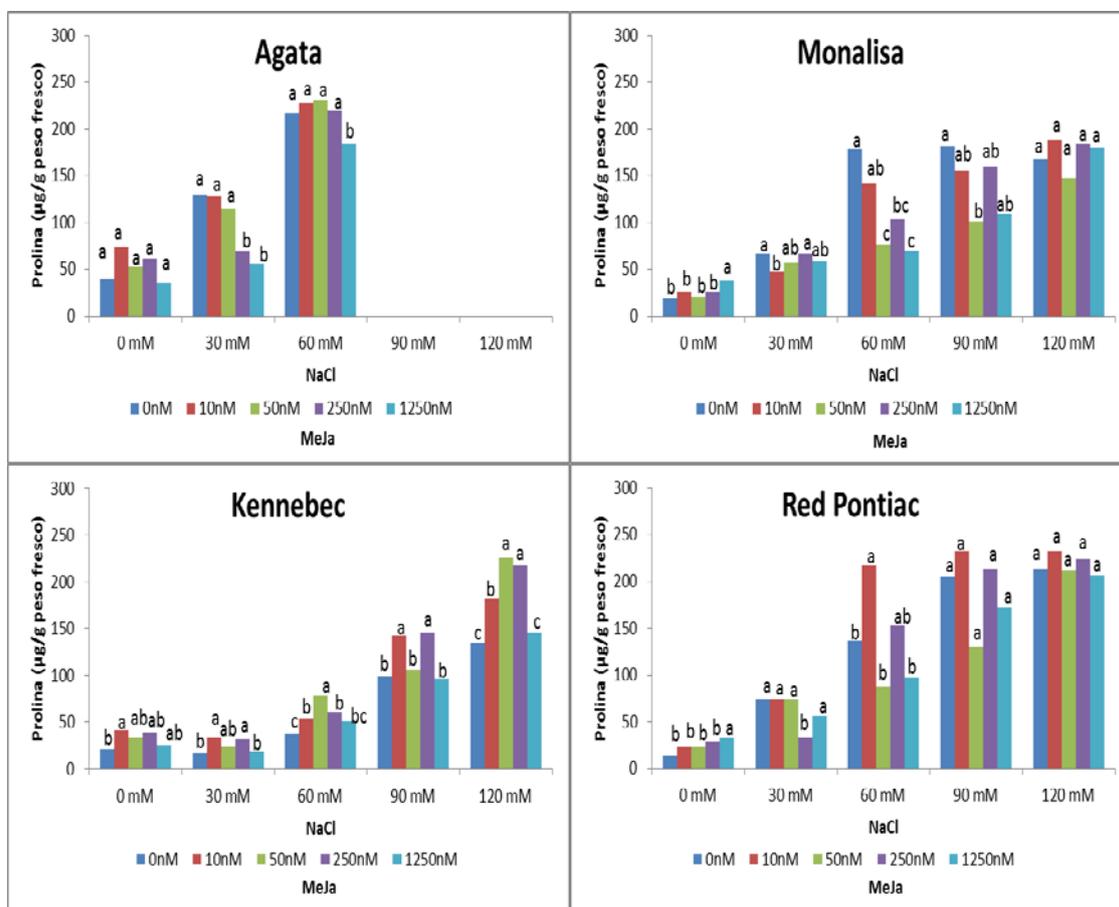
** El análisis de la prolina se realizó utilizando el tallo y las hojas de los explantos.

Figura 36. Contenido de prolina detectado en los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a concentraciones de MeJa.

En el cultivar Agata el contenido de prolina no presentó diferencias significativas entre las concentraciones de MeJa evaluadas; no obstante, la variación entre las muestras fue alta y las concentraciones de MeJa 10, 50 y 250nM aumentaron el contenido de prolina, en algún caso hasta casi duplicarla respecto al control sin MeJa (Figura 36). La aplicación de concentraciones de hasta 250nM de MeJa en el cultivar Monalisa no causó diferencias significativas en el contenido de prolina frente al control, solo la máxima concentración de MeJa, 1250nM, incrementó significativamente el contenido de prolina (Figura 36).

En el cultivar Kennebec la adición de 10nM de MeJa incrementó significativamente el contenido de prolina respecto al control. Sin embargo, concentraciones superiores de MeJa no tuvieron efectos significativos sobre el contenido de prolina (Figura 36). En Red Pontiac se observó un efecto similar al del cultivar Monalisa. La aplicación de las

concentraciones de MeJa de hasta 250nM no presentaron diferencias significativas para el contenido de prolina respecto al control, no obstante el contenido de prolina aumentó significativamente con la adición de 1250nM de MeJa (Figura 36).



*Letras diferentes por concentración salina en cada cultivar de patata indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 37. Contenido de prolina detectado en los explantos de los cuatro cultivares de patata expuestos a concentraciones de MeJa y NaCl.

El incremento del contenido de prolina bajo condiciones de estrés salino se redujo en algunos casos con la aplicación de MeJa. En el cultivar menos tolerante a la salinidad, Agata, cultivado en ausencia de NaCl el contenido de prolina en los explantos no presentó diferencias significativas tras la adición de todas las concentraciones de MeJa. Al incrementar el estrés salino a 30mM el contenido de prolina en los explantos aumentó, sin embargo en estas condiciones de salinidad las concentraciones de 250 y 1250nM de MeJa redujeron significativamente el contenido de prolina a valores similares a los observados en ausencia de salinidad. Un efecto similar se observó al

incrementar la salinidad a 60mM donde la concentración máxima de MeJa redujo significativamente el contenido de prolina (Figura 37).

En el cultivar Monalisa cultivado sin salinidad el contenido de prolina aumentó significativamente con la concentración máxima de MeJa. Al incrementar el estrés salino a 30mM el contenido de prolina aumentó respecto al control, pero en estas condiciones se redujo, ligeramente, con las concentraciones de MeJa; esta reducción fue significativa únicamente con 10nM de MeJa. En los explantos cultivados con 60mM de NaCl el contenido de prolina aumentó de forma considerable respecto al control sin salinidad, sin embargo en esta salinidad las concentraciones de 50 a 1250nM de MeJa redujeron significativamente el contenido de prolina. Un efecto similar se observó en los explantos cultivados con 50 y 1250nM de MeJa y expuestos a 90mM de NaCl. En la concentración salina de 120mM no se observaron diferencias significativas respecto al tratamiento control sin MeJa (Figura 37).

En el cultivar más tolerante al estrés salino, Kennebec, el contenido de prolina de los explantos fue similar al observado en el resto de cultivares cultivados en ausencia de salinidad. En los explantos cultivados con 30mM de NaCl el contenido de prolina no aumentó respecto al tratamiento control sin salinidad, sin embargo las concentraciones de MeJa 10 y 250nM aumentaron significativamente el contenido de prolina en los explantos cultivados con 30mM de NaCl. Al incrementar la salinidad a 60mM, el contenido de prolina en los explantos también aumento respecto al tratamiento control; a esta concentración salina, 60mM, las concentraciones entre 10, 50 y 250nM de MeJa incrementaron significativamente el contenido de prolina. Al incrementar el estrés salino a 90mM el contenido de prolina aumentó significativamente y de forma importante; en esta concentración salina aumentó aún más con 10 y 250nM de MeJa mientras que las concentraciones de 50 y 1250nM de MeJa no mostraron diferencias significativas respecto al control. Un efecto similar se observó con 120mM de NaCl donde las concentraciones de MeJa de 10 a 250nM incrementaron el contenido de prolina y la concentración máxima ensayada de MeJa no presentó diferencias significativas con el control (Figura 37).

En los explantos del cultivar Red Pontiac cultivados sin estrés salino y expuestos a las concentraciones de 10, 50 y 250nM de MeJa, el contenido de prolina fue muy similar al de los explantos sin MeJa, sin embargo la concentración más alta de MeJa, 1250nM, aumentó significativamente el contenido de prolina en los explantos. Al incrementar la concentración salina a 30mM el contenido de prolina en los explantos aumentó respecto al tratamiento control. Las concentraciones de MeJa no aumentaron el contenido de prolina en los explantos (Figura 37).

Al incrementar la salinidad a 60mM el contenido de prolina en los explantos aumentó de forma importante. En estas condiciones, la adición de 10nM de MeJa aumentó significativamente el contenido de prolina en los explantos. Al incrementar la salinidad a 90mM el contenido de prolina en los explantos aumentó respecto al control sin salinidad. En este caso la adición de MeJa no causó diferencias significativas para el contenido de prolina en los explantos en ninguna de las concentraciones ensayadas. Un efecto similar se observó cuando los explantos se cultivaron con 120mM de NaCl; el contenido de prolina en los explantos también aumentó respecto al control sin salinidad, aunque no más que con el nivel de salinidad anterior, 90mM, y la adición de MeJa no causó diferencias significativas en el contenido de prolina de los explantos independientemente de cual fuera la cantidad de MeJa aportado (Figura 37).

7.4. DISCUSIÓN

En este experimento se observó que en general los contenidos de prolina aumentaron gradualmente con el estrés salino en los cuatro cultivares de patata evaluados. El promedio del contenido de prolina de los cuatro cultivares expuestos a las diferentes concentraciones salinas, aumentó un 207% con 30mM de NaCl, un 512% con 60mM, un 597% con 90mM y un 637% con 120mM respecto al tratamiento control. Este es un mecanismo de respuesta propio de la planta frente al estrés salino reportado previamente en otros cultivares de patata *in vitro* (Fidalgo et al., 2004; Texeira y Pereira, 2007; Aghaei et al., 2008). La planta expuesta al estrés salino acumula prolina, la cual permite mantener un balance iónico en el citoplasma y en las vacuolas permitiendo mantener el flujo de agua en la planta (Hasegawa et al., 2000; Singh, et al., 2000; Zhifang y Loescher, 2003). En base a estos resultados se demostró que la prolina es un identificador del estrés salino, observándose que a mayor estrés salino mayor es la acumulación de prolina en los tejidos.

En los análisis individuales por cultivar se observó que en los explantos del cultivar Agata expuestos a 30 y 60mM de NaCl, el contenido de prolina aumentó 325 y 549%, respectivamente frente al control sin salinidad. El contenido de prolina en los explantos del cultivar Monalisa aumentó un 355% cuando se cultivaron con 30mM de NaCl; al incrementar la salinidad a 60, 90 y 120mM de NaCl el contenido de prolina aumentó aproximadamente un 950% respecto al control. En los explantos del cultivar Kennebec cultivados con 30mM de NaCl el contenido de prolina disminuyó ligeramente pero sin presentar diferencias significativas con el control, al incrementar el estrés salino a 60mM de NaCl el contenido de prolina aumentó 174% frente al control. El incremento de la concentración salina a 90 y 120mM también aumentó el contenido de prolina aunque en un grado sustancialmente menor, un 461 y 630%, respectivamente frente al control; no obstante, el contenido de prolina en los explantos del cultivar Kennebec expuestos a cualquiera de las concentraciones salinas, fue menor respecto a los obtenidos en los cultivares Agata, Monalisa y Red Pontiac. Estudios previos llevados a cabo en esta especie demostraron que los cultivares más tardíos, en general, presentan una mayor adaptación al condiciones adversas debido a que las etapas fenológicas son más largas que en los cultivares más tempranos (Iwama, 1998).

Asimismo, en estudios previos el cultivar Kennebec demostró ser más tolerante al estrés salino que el cultivar Concord, presentando un menor contenido de prolina y un mayor desarrollo (Aghaei et al., 2008).

Por otra parte, es posible que la aplicación exógena de MeJa también incremente el contenido de prolina cuando los explantos son cultivados sin estrés salino, aunque en los ensayos realizados en ausencia de salinidad el incremento debido al MeJa fue muy inferior al observado con el estrés salino. El promedio general de los cuatro cultivares ensayados muestra que la concentración de MeJa 10nM incrementó el contenido de prolina un 77%, con 50nM aumentó un 39%, con 250nM aumentó un 64% y con 1250nM aumentó un 40%. Es importante recalcar que la concentración de MeJa, que aumentó significativamente el contenido de prolina en los explantos fue solo la de 1250nM, en los cultivares Monalisa y Red Pontiac. Resultados similares han sido observados en cebada, *Hordeum vulgare*, donde el contenido de prolina aumentó en plantas pre-tratadas con JA 15 μ M, respecto al control (Bandurska et al., 2003). El incremento del contenido de prolina debido a la aplicación de MeJa podría deberse a que éste active la expresión de genes de la planta relacionados con las respuestas de defensa ante situaciones adversas para soportar el estrés (Kazan y Manners, 2008). Una de las respuestas al estrés debida a la aplicación de MeJa puede estar relacionada con la señal de transcripción de los genes responsables del ABA, el cual elicitó la acumulación de prolina en los tejidos de las plantas (Kim et al., 2009). El ABA es la hormona vegetal relacionada con la respuesta al estrés osmótico (Bandurska et al., 2003).

El análisis de la interacción salinidad por MeJa mostró una respuesta independiente del cultivar. Recientemente se ha demostrado que la aplicación exógena de MeJa restringe la acumulación de prolina en plantas de colza, *Brassica napus*, sensible a la salinidad, cuando son expuestas al estrés salino (Huget et al., 2003). Por el contrario, en plantas de cebada, *Hordeum vulgare*, especie descrita como tolerante a la salinidad, se demostró que los contenidos de prolina se incrementaron al tratarlas con JA (Maslenkova et al., 1992). En soja, *Glycine max*, especie altamente sensible a la salinidad, cultivadas con un estrés salino de 60mM, la aplicación de 20 y 30 μ M de MeJa incrementó los contenidos de prolina (Yoon et al., 2009). Nuestros resultados difieren con los descritos por Yoon et al, (2009), en nuestro ensayo, el cultivar menos tolerante Agata el contenido de prolina aumentó ligeramente con la adición de MeJa al medio de cultivo mientras que

bajo condiciones de estrés salino de 30 ó 60mM las concentraciones de MeJa más altas redujeron significativamente el contenido de prolina en los explantos. De forma similar en los cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac, algo más tolerantes a la salinidad que Agata, las adición de MeJa al medio de cultivo aumentó el contenido de prolina en los explantos cultivados en ausencia de salinidad. Sin embargo, al incrementar la concentración salina hasta 120mM el contenido de prolina aumentó con algunas de las concentraciones de MeJa únicamente en el cultivar más tolerante Kennebec; en los cultivares Monalisa y Red Pontiac expuestos a salinidad el contenido de prolina se redujo con algunas concentraciones de MeJa y en algunos casos no presentó diferencias significativas con el control sin MeJa. Resultados similares han sido descritos previamente en cebada, *Hordeum vulgare*, por Maslenkova et al. (1992) quienes demostraron que el contenido de prolina aumentó al tratarlas con JA. Más estudios son necesarios para determinar el efecto del MeJa frente al estrés salino.

Cuando los explantos del cultivar de patata Agata fueron expuestos a una salinidad de 30mM las concentraciones de 250 y 1250nM de MeJa redujeron el contenido de prolina; este mismo efecto se observó a una salinidad de 60mM en la que el contenido de prolina se redujo con la concentración máxima de MeJa. En los cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac expuestos a una salinidad de 30mM el contenido de prolina no fue muy diferente del de las plantas control aunque algunas de las concentraciones de MeJa redujeron el contenido de prolina en los cultivares Monalisa y Red Pontiac, mientras que en el cultivar Kennebec algunas de las concentraciones de MeJa lo aumentaron. Es importante destacar que el contenido de prolina observado en los explantos del cultivar Kennebec, expuesto a 30mM de NaCl fue el más bajo respecto al resto de los cultivares. Al relacionar la concentración de prolina con el desarrollo vegetativo y radical de los explantos se observó que la adición de MeJa provocó poca variación en el contenido de prolina pero incrementó el desarrollo vegetativo y radical de los explantos, y de forma contraria, el estrés salino incrementó la concentración de prolina y redujo el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares.

Al incrementar la salinidad a 60mM el contenido de prolina en los cultivares Agata y Monalisa se redujo con las concentraciones entre 50 y 1250nM de MeJa respecto al control sin MeJa. Por el contrario en el cultivar Kennebec cultivado con 60mM de NaCl el contenido de prolina aumentó con varias de las concentraciones de MeJa utilizadas, no obstante su contenido de prolina siguió siendo menor que en el resto de los cultivares. Bajo condiciones de estrés salino 90mM, las concentraciones de MeJa de 50 y 1250nM resultaron en un menor contenido de prolina en los explantos del cultivar Monalisa. De nuevo de forma contraria, en el cultivar Kennebec las concentraciones de MeJa de 10 y 250nM incrementaron el contenido de prolina mientras que, las concentraciones de MeJa produjeron valores similares al control sin MeJa. Una vez más los contenidos de prolina observados en el cultivar Kennebec fueron los más bajos respecto al resto de los cultivares evaluados. A la concentración salina máxima ensayada el contenido de prolina no presentó diferencias significativas con el control sin MeJa en los cultivares Monalisa y Red Pontiac; sin embargo, en el cultivar Kennebec las concentraciones de MeJa de 10, 50 y 250nM aumentaron significativamente el contenido de prolina.

En resumen, cuando los explantos de los cuatro cultivares de patata fueron cultivados en ausencia de estrés salino la adición de MeJa incrementó el contenido de prolina respecto al control sin MeJa así como también incrementó el desarrollo vegetativo y radical de los explantos. Al incrementar la salinidad a 30mM de NaCl, concentración que no afectó al desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cultivares Monalisa y Red Pontiac, la adición de MeJa no causó cambios en el contenido de prolina. Mientras que en el cultivar Kennebec las concentraciones de 30 y 60mM de NaCl tampoco afectaron al desarrollo vegetativo y radical de los explantos, la aplicación de MeJa sí incrementó ligeramente el contenido de prolina en los explantos. Sin embargo, en con concentraciones salinas superiores y que afectaron el desarrollo vegetativo y radical de los explantos, el contenido de prolina aumentó de forma considerable respecto al control sin salinidad y la aplicación de MeJa, en algunos casos, redujo significativamente el contenido de prolina y en otros no presentó diferencias significativas con el control sin MeJa. No obstante, la aplicación de MeJa incrementó el desarrollo vegetativo y radical de los explantos expuestos a altas concentraciones salinas.

Cuando los explantos de los cultivares Monalisa y Red Pontiac fueron expuestos a 30mM de NaCl y Kennebec a las concentraciones de 30 y 60mM de NaCl, concentraciones que no afectaron al desarrollo vegetativo y radical de los explantos, la concentración de prolina aumentó ligeramente respecto al control sin salinidad y la adición de MeJa tampoco incrementó su contenido; este efecto se observó en los cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac cultivados con 30mM de salinidad. Sin embargo, al aumentar el estrés salino a niveles que afectan negativamente el desarrollo vegetativo y radical de los explantos el contenido de prolina aumentó de forma considerable respecto al control sin salinidad. Bajo condiciones de estrés salino que afectan al desarrollo de los explantos la aplicación exógena de las concentraciones de MeJa tampoco provocaron cambios en el contenido de prolina en los cultivares Agata, Monalisa y Red Pontiac pero sí favorecieron un mayor desarrollo vegetativo y radical de los explantos expuestos a 90 y 120mM de NaCl. En el cultivar clasificado como tolerante a la salinidad, Kennebec cultivado con 90 y 120mM de salinidad las concentraciones de MeJa incrementaron el contenido de prolina, lo cual sugiere que para este cultivar este aumento de la prolina puede estar relacionado directamente con el mayor desarrollo vegetativo y radicular de los explantos cultivados con 90 y 120mM de NaCl.

7.5. CONCLUSIONES

- La prolina mostró estar relacionada con la tolerancia al estrés salino en los cuatro cultivares de patata evaluados.
- El contenido de prolina en la mayoría de los cultivares no mostró estar relacionada con la aplicación exógena de MeJa cuando el desarrollo vegetativo y radical de los explantos no es afectado negativamente por el estrés salino.
- El aumento de la concentración de prolina en el cultivar tolerante Kennebec favorece un mayor desarrollo vegetativo y radical bajo condiciones de alta salinidad.
- El contenido de prolina aumentó progresivamente con el aumento del estrés salino en los cuatro cultivares.
- Bajo condiciones de estrés salino de hasta 90mM el cultivar Kennebec presentó los menores contenidos de prolina respecto al resto de cultivares evaluados.
- La aplicación exógena de MeJa aumentó ligeramente el contenido de prolina en todos los cultivares cultivados en ausencia de estrés salino.
- La concentración de 1250nM de MeJa redujo el contenido de prolina en los explantos del cultivar Agata expuestos a 30mM.
- La concentración de 1250nM de MeJa redujo el contenido de prolina en los explantos de los cultivares Monalisa y Red Pontiac expuestos a 60 y 90mM de NaCl.
- Bajo condiciones de estrés salino en el cultivar Kennebec, las concentraciones de MeJa aportadas al medio de cultivo incrementaron el contenido de prolina en los explantos

7.6. REFERENCIAS

Aghaei, K; Ehsanpour, A; Balali, G y Mostajeran, A. 2008. In vitro screening of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars for salt stress tolerance using physiological parameters and RAPD analysis. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 3(2): 159-164.

Aghaei, K; Ehsanpour, A y Komatsu, S. 2008. Proteome analysis of potato under salt stress. *Journal of Proteome Research* 7: 4858-4868.

Bandurska, H; Stroinski, A y Kubis, J. 2003. The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes. *Biologia Plantarum* 25(3): 279-285.

Bates, L. S; Waldren, R. P y Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.

Chiang, H. H y Dandekar, A. M. 1995. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis* during development and in response to desiccation. *Plant Cell and Environment* 18: 1280-1290.

De Ronde, J. A; Laurie, R. N; Caetano, T; Gray Linng, M. M y Kerepesi, I. 2004. Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. *Euphytica* 138: 123-132.

Fidalgo, F; Santos, A; Santos, I y Salema, R. 2004. Effects on long-term salt stress on antioxidant defense systems, leaf water relation and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annual of Applied Biology* 145: 185-192.

Hare, P. D y Cress, W. A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.

Harris, P. M. 1978. *The potato crop*. 1 ed. London: Chapman and Hall Ltd. 730p.

Hasegawa, P; Bresa, R; Zhu, J y Bohnert, H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

Hu, C. A; Delauney, A. J y Verma, D. P. S. 1992. A bifunctional D1-enzyme pyrroline-5-carboxylate synthetase catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of Natural Academic Science* 89: 9354-9358.

- Huget, R; Sulpice, R; Lefort, C; Maerskaick, V; Emery, N y Lather, F.R. 2003. The suppression of osmoinduced proline response of *Brassica napus* L. var. *oleifera* leaf discs by polyunsaturated fatty acids and methyl-jasmonate. *Plant Science* 164: 119-127.
- Iwama, K. 1998. Development of nodal and lateral roots in potato under field conditions. *Journal Fac-Agri. Hokkaido. University* 68: 33-44.
- Jaarsma, R; Rozemarijn, S y H. de Boer, A. 2013. Effect of salt stress on growth, Na⁺ accumulation and proline metabolism in Potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *PLoSone* 8(3):1-10.
- Kazan, K y Manners, J. 2008. Jasmoante signaling toward an integrated view. *Plant Physiology* 146: 1459-1468.
- Kim, E. H; Park, S. H y Kim, J. K. 2009. Methyl jasmonate triggers loss of grain yield under drought stress. *Plant Signal Behaviour* 4: 348-349.
- Maslenkova, L; Miteva, T y Popova, L. 1992. Changes in the polypeptide patterns of barley seedlings exposed to jasmonic acid. *Plant Physiology* 98: 700-707.
- Ribarits, A; Abdullaev, A; Tashpulatov, A; Richter, A; Heberle-Bors, E y Touraev, A. 2007. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. *Planta* 225: 1313-1324
- Saradhi, P; Alia, P; Arora, S y Prasad, K. V. 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochemical Biophysics Research Communications* 209: 1-5.
- Schwacke, R; Grallanth, S; Breikreuz, K E; Stransky, H; Frommer, W B y Rentsch, D. 1999. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* 11: 377-391.
- Singh, S.K; Sharma, H.C; Goswami, A.M; Datta, S.P y Singh, S.P. 2000. In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biologia Plantarum* 43: 283-286.
- Siripornadulsil, S; Train, S; Verma, D. P y Sayre, R. T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14: 2837-2847.
- Smirnoff, N y Cumbes, Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060.

Spollen, W. G; Tao, W; Valliyodan, B; Chenk; Hejlek, L. G y Kim, J. J. 2008. Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential. *BMC Plant Biology* 8: 1-32.

Szabados, L y Savoure, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.

Texeira, J y Pereira, S. 2007. High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 60: 121-126.

Verbruggen, N y Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: A Review. *Aminoacids* 35: 739.

Voetberg, G. S y Sharp, R. E. 1991. Growth of maize primary root tip at low water potentials III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiology* 96: 1125-1130.

White, F F; Taylor, B H; Huffmman, G A; Gordon, M P y Nester, E W. 1985. Molecular and genetic analysis of transferred DNA regions of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* 164: 33-44.

Xin, Z y Browse, J. 2008. Eskimo1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing – tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A* 95: 7799-7804.

Yoon, J. Hamayun, M., Lee, S y Lee, I. 2009. Methyl jasmonate alleviating salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science Biotechnology* 12(2): 63-68.

Zhang, H. Q; Croes, A y Linskens, H. 1982. Protein synthesis in germinating pollen of *Petunia*: Role of proline. *Planta* 154: 199-203.

Zhifang, G y Loescher, W. 2003. Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induce biosynthesis of both mannitol and glucosyl-mannitol dimmer. *Plant Cell Environment* 26: 275-283.

**8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA
Y PEROXIDASA EN EXPLANTOS DE PATATA DEL CULTIVAR KENNEBEC
EXPUESTOS AL ESTRÉS SALINO Y A CONCENTRACIONES DE METIL
JASMONATO**

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA Y PEROXIDASA EN EXPLANTOS DE PATATA DEL CULTIVAR KENNEBEC EXPUESTOS AL ESTRÉS SALINO Y A CONCENTRACIONES DE METIL JASMONATO.

8.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente la salinidad es un factor limitante que afecta a la producción de cultivos. El efecto negativo de la salinidad sobre las plantas involucra la reducción del área foliar, el número de tallos, la cantidad de raíces, la altura de las plantas y la longitud de las raíces. Sin embargo, la tolerancia a la salinidad ha demostrado ser variable entre especies e incluso entre cultivares (Dasgupta et al., 2008).

Para hacer frente al efecto negativo que causan los diferentes tipos de estrés abiótico y, en especial el salino, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa que les permiten continuar manteniendo sus funciones fisiológicas. En este sentido se conoce que los efectos negativos de la salinidad se deben principalmente a tres procesos: a) el estrés osmótico, b) la interrupción de las actividades metabólicas debidas a un imbalance de iones y c) a la interferencia de los iones del NaCl en la absorción de los macro y micronutrientes (Daneshmand y Arvin, 2010). Estos procesos están relacionados con la producción de las especies reactivas al oxígeno (ROS), del inglés “reactive oxygen species”, consideradas como uno de los factores que más daño causan en las células y plantas expuestas al estrés salino (Khan y Panda, 2002). Las ROS son radicales libres, átomos o grupos de átomos que poseen un electrón impar que los hace inestables, favoreciendo así reacciones rápidas con cualquier molécula para generar más radicales libres (Foyer y Halliwell, 1976). Se ha demostrado que orgánulos como los cloroplastos, mitocondrias o peroxisomas con alta actividad oxidativa o con un flujo intenso de electrones son la mayor fuente de ROS en las células de las plantas (Kan y Panda, 2002).

La capacidad de las plantas para convertir la radiación visible en energía en forma de compuestos orgánicos es un proceso que de por sí es crítico para las plantas debido a que la actividad fotosintética ya implica por si mismo un daño oxidativo que provoca la acumulación de ácidos grasos polinsaturados en la cubierta de los cloroplastos y el cual es eficazmente mitigado por los mecanismos antioxidantes propios de las plantas (Singh Gill y Tuteja, 2010).

La producción de especies reactivas al oxígeno (ROS), como el ion superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidróxilo (OH^\cdot) es común en las plantas pero son habitualmente eliminadas de forma eficiente por mecanismos antioxidativos. Sin embargo, situaciones de estrés como pueden ser las altas temperaturas, la presencia de metales pesados en el suelo, la sequía, la deficiencia nutricional o la salinidad, provocan que los niveles de especies reactivas al oxígeno aumenten y se acumulen rápidamente alterando el metabolismo normal de las células y provocando el daño oxidativo a nivel celular en las membranas, en sus proteínas y en los ácidos nucleicos; también provocan la peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas y también pueden causar la mutación del ADN (Imlay, 2003; Singh Gill y Tuteja, 2010; Joseph y Jini, 2011).

Para prevenir o hacer frente a los daños provocados por las ROS, las plantas han desarrollado un sistema antioxidante complejo. Este sistema tiene como principales componentes los carotenoides, el ascorbato, el glutatión y los tocoferoles; adicionalmente también poseen las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la peroxidasa (POD), la glutatión peroxidasa (GPX), la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR) (Hernandez et al., 2000).

La catalasa (CAT) es una enzima que permite la detoxificación de las ROS mediante la catálisis rápida del H_2O_2 en H_2O y O_2^- durante situaciones de estrés; es una de las enzimas más eficientes en la detoxificación; una molécula de CAT puede convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de H_2O_2 en H_2O y O_2^- por minuto, lo cual hace de ella una enzima imprescindible para eliminar el H_2O_2 generado en los peroxisomas por la oxidación de los ácidos grasos, la fotorespiración y el catabolismo de la purina (Singh Gill y Tuteja, 2010). La catalasa ha sido estudiada en varias especies vegetales expuestas a situaciones de estrés abiótico, por ejemplo Aghaei et al. (2009) demostraron que en la parte aérea de los explantos del cultivar Kennebec expuestos a 60mM de NaCl la actividad de la CAT no varió respecto al control, sin embargo con 90mM la actividad de la enzima se redujo significativamente. De forma contraria en este mismo trabajo la actividad de la CAT se redujo progresiva y significativamente en los explantos del cultivar Concord expuestos a 60 y 90mM de salinidad.

La peroxidasa es una enzima principalmente localizada en la pared celular y vacuolas, cataliza la reducción de H_2O_2 en agua utilizando electrones de varias moléculas donadoras. Esta actividad redox permite oxidar algunas sustancias como polifenoles, flavonoides, alcaloides, o promover la oxidación de los polímeros de la pared celular (Fry, 1986). El amplio espectro de reacciones bioquímicas que la peroxidasa es capaz de catalizar y el gran número de isoformas explican la dificultad del estudio de la peroxidasa en las plantas (Carpin et al., 1999). Por una parte, Aghaei et al. (2009) demostraron que en tallos de los cultivares de patata Kennebec y Concord cultivados *in vitro*, la actividad de la POD se redujo significativamente con el aumento del estrés salino hasta 90mM. El cultivar más tolerante a la salinidad, Kennebec, presentó una mayor actividad enzimática de la POD. Daneshmand y Alvin (2010) también confirmaron que en explantos *Solanum stoloniferum*, *Solanum bulbosum* y *Solanum acaule* cultivados *in vitro* y expuestos a un estrés salino de hasta 120mM la actividad de la peroxidasa se incrementó, la máxima actividad de la enzima se observó con 80mM de NaCl y a 120mM la actividad enzimática fue superior al control pero sin presentar diferencias significativas.

Por otra parte, los jasmonatos son un grupo de hormonas vegetales entre cuyas funciones están la defensa de las plantas ante situaciones de estrés. Los mecanismos de respuesta debidos al MeJa son complejos ya que no solo regula la respuesta de desarrollo de las plantas, sino que su síntesis también está influenciada por el ataque de patógenos y herbívoros (Faurie et al., 2009). Sin embargo, los factores involucrados en la activación de las defensas de las plantas debidas al MeJa aún no son del todo conocidos, pero se ha demostrado que cultivares de tomate, *Lycopersicon esculentum*, tolerantes a la salinidad poseen mayor concentración de jasmonatos que los cultivares sensibles (Hilda et al., 2003). En ajeno, *Artemisia annua* L., aplicaciones exógenas de 300 μ M de MeJa incrementaron la actividad de la CAT y redujeron la toxicidad del boro (Aftab et al., 2011). En plantas de maíz, *Zea mays*, cultivadas bajo condiciones controladas en invernadero, la aplicación exógena de MeJa de 5 y 20 μ M no causó efectos sobre la actividad de la CAT, sin embargo a una concentración de 50 μ M la actividad de la CAT aumentó significativamente y a una concentración más alta, de 100 μ M, disminuyó significativamente respecto al control (Nojavan-Asghari y Norastehnia, 2006; Li, et al., 2012).

El objetivo de este ensayo fue determinar las variaciones en la actividad antioxidante de la CAT y de la POD en el cultivar de patata Kennebec expuesto a estrés salino y el posible efecto protector del metil jasmonato ante el estrés oxidativo (ROS) ejercido mediante las variaciones que pueda causar en la actividad de estas dos enzimas.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la actividad de la CAT y POD se prepararon extractos vegetales a partir de 5 réplicas conjuntas de tallos y hojas de los explantos del cultivar Kennebec cultivados durante 4 semanas en una cámara de cultivo a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y expuestos a la combinación de las concentraciones salinas de 0, 30, 60, 90 y 120mM y de 0, 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa. El extracto enzimático se obtuvo pesando 200 mg de tallos y hojas frescos (muestra conjunta de 4-5 explantos) que se homogeneizaron con 5ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 6,4) con la ayuda de un mortero. El extracto se centrifugó a 4°C y 5000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante resultante se utilizó como extracto enzimático para la determinación de la actividad enzimática de la CAT y de la POD.

La actividad de la enzima catalasa (EC 1.11.1.6) se determinó siguiendo el método descrito por Aebi (1983) con algunas modificaciones. La actividad de la enzima se determinó a $23\text{-}25^\circ\text{C}$ midiendo el descenso de la absorbancia de la reacción en base al H_2O_2 a 240nm durante 1 minuto y a intervalos de 15 segundos utilizando un espectrofotómetro equipado con lámpara U.V. La reacción se realizó en una cubeta de cuarzo de volumen total 3 ml donde se pipetearon 2,6ml de tampón fosfato 0,1M (pH 6,4); obtenido a partir de la mezcla de 19,2ml de una solución de K_2HPO_4 1M con 80,8ml de una solución de KH_2PO_4 1M, más 0,2ml de una solución de H_2O_2 10mM en agua destilada; la reacción se inició pipeteando 0,2ml del extracto enzimático sobre la cubeta del espectrofotómetro. Una unidad de catalasa fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 mol de H_2O_2 por minuto (coeficiente de extinción $36\text{mM}\cdot\text{cm}^{-2}$).

La actividad de la catalasa (U/ml) se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad U/ml} = \frac{\Delta A (240\text{nm})}{0,036 (\text{cm}^2/\mu\text{mol}) \times t (\text{min}) \times b (\text{cm})}$$

Dónde:

ΔA = Diferencia en absorbancia a 240nm en 1 minuto

$0,036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ = coeficiente de extinción del H_2O_2 .

t = Tiempo de duración de la reacción (1 min).

b = Ancho de la cubeta (1cm).

La actividad de la peroxidasa (EC 1.11.1.7) se determinó siguiendo el método descrito por Amako et al. (1994) con algunas modificaciones. La actividad de la enzima se determinó a 23-25°C midiendo el descenso de la absorbancia del H_2O_2 a 436nm durante 1 minuto y a intervalos de 15 segundos utilizando un espectrofotómetro. La reacción se realizó en una cubeta de volumen total 3ml donde se pipeteó 2,8ml de tampón fosfato 0,1M (pH 6,4), obtenido añadiendo 19,2ml de una solución de K_2HPO_4 1M a 80,8ml de una solución de KH_2PO_4 1M, más 0,05ml de una solución de H_2O_2 al 30% y 0,05ml de una solución 0,018M de Guayacol. La reacción se inició con la adición de 0,1ml del extracto enzimático. Una unidad de peroxidasa fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1mol de H_2O_2 por minuto (coeficiente de extinción del guayacol es $25,5\text{mM cm}^{-2}$).

La actividad de la peroxidasa (U/ml) se determinó utilizando la siguiente formula:

$$\text{Actividad U/ml} = \frac{\Delta A (436\text{nm}) \times 4 \times V_t \times f_d}{25,5 \times V_s}$$

Dónde:

ΔA = Diferencia en absorbancia a 436nm en 1 minuto.

4 = Constante de la unidad de definición y principio.

V_t = Volumen final de la reacción (3ml).

f_d = Factor de dilución del extracto enzimático (1).

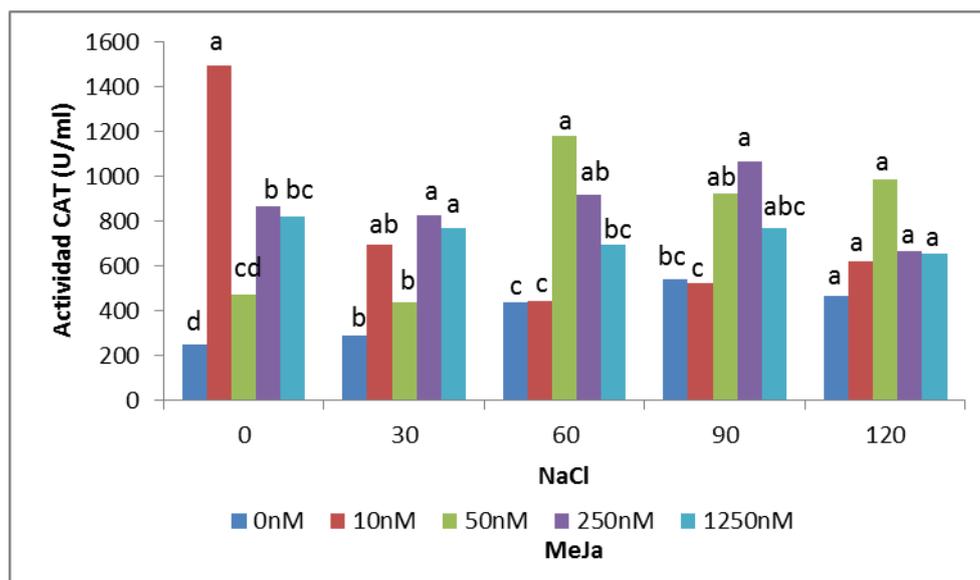
$25,5 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ = coeficiente de extinción molar del guayacol.

V_s = Volumen de la muestra (0,1ml).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA para cada enzima; en su caso la separación de medias se obtuvo empleando el test de Tukey ($p < 0,05$) del paquete estadístico SAS versión 9.

8.3. RESULTADOS

En los explantos de patata *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* del cultivar Kennebec, cultivados en ausencia de estrés salino, la adición de 10, 250 y 1250nM de MeJa incrementó significativamente la actividad enzimática de la CAT respecto al control (Figura 38).



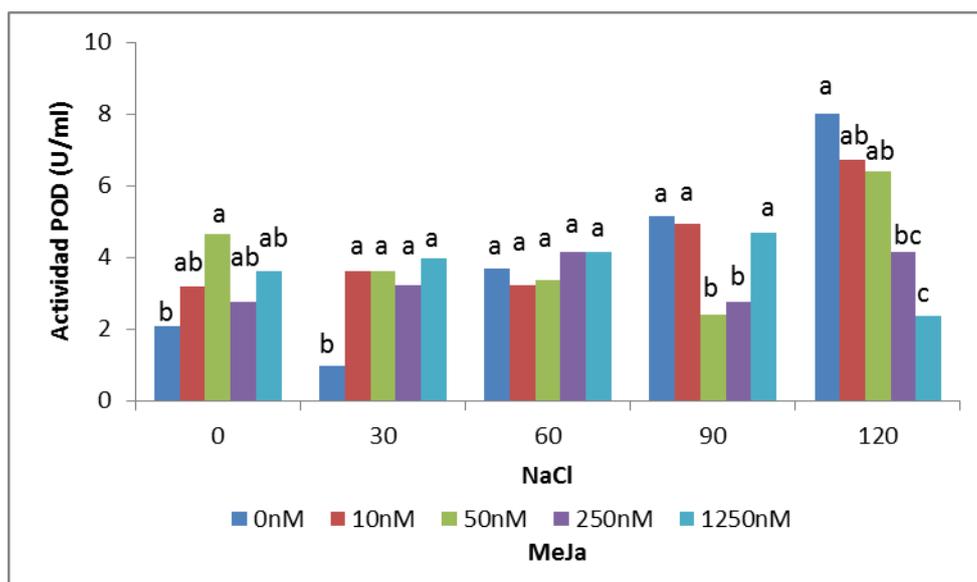
* Letras diferentes en cada concentración salina indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 38. Actividad de la catalasa (CAT) en explantos del cultivar de patata Kennebec expuestos a concentraciones de 0, 30, 60, 90 y 120mM de NaCl y 0, 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa.

La actividad de la CAT en los explantos del cultivar Kennebec aumentó ligeramente al incrementar el estrés salino hasta 90mM (Figura 38). Cuando los explantos se cultivaron en ausencia de salinidad la mayoría de las concentraciones de MeJa ensayadas incrementaron significativamente la actividad de la CAT respecto al control sin MeJa (Figura 38). Un efecto similar se observó cuando los explantos fueron expuestos a un estrés salino de 30mM. La concentración mínima de MeJa no fue suficiente para incrementar la actividad de la CAT, mostrando valores similares al control sin MeJa. Las concentraciones de 250 y 1250nM de MeJa incrementaron significativamente la actividad de la CAT (Figura 38). Al incrementar el estrés salino a 60 y 90mM la actividad de la CAT incrementó significativamente con el aporte de 50 y 250nM de MeJa, mientras que los incrementos por aportes superiores de MeJa no fueron significativos (Figura 38). En la concentración salina máxima ensayada, 120mM, no se observaron diferencias significativas para la actividad de la CAT entre todas las

concentraciones de MeJa evaluadas, no obstante se observó la misma tendencia del incremento de la actividad de la CAT con las concentraciones de MeJa, en particular con 50nM (Figura 38).

En los explantos del cultivar de patata Kennebec cultivados en ausencia de salinidad la actividad de la POD no presentó diferencias significativas debida a la adición de ninguna de las concentraciones de MeJa ensayadas (Figura 39).



*Letras diferentes en cada concentración salina presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 39. Actividad de la peroxidasa (POD) en explantos del cultivar de patata Kennebec expuestos a concentraciones de 0, 30, 60, 90 y 120mM de NaCl y 0, 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa.

De forma general se observó que la actividad de la POD en los explantos del cultivar Kennebec aumentó con la exposición al estrés salino a partir de 60mM (Figura 39). La adición de las concentraciones de MeJa al medio de cultivo incrementó la actividad de la POD en los explantos cultivados sin salinidad, siendo este incremento significativo con la concentración de 50nM de MeJa (Figura 39). Al incrementar el estrés salino a 60mM la adición de MeJa no causó diferencias significativas en la POD (Figura 39). Al aumentar la concentración salina a 90mM las concentraciones de 10 y 1250nM de MeJa presentaron valores similares al control sin MeJa, sin embargo las de 50 y 250nM de MeJa redujeron significativamente la actividad de la POD (Figura 39). Con el estrés salino máximo aplicado, 120mM, todas las concentraciones de MeJa redujeron la actividad de la POD, esta reducción fue progresiva con el aumento de la concentración de MeJa, siendo significativamente menor con las concentraciones de 250 y 1250nM de MeJa (Figura 39).

8.4. DISCUSIÓN

El MeJa presenta varios modos de acción sobre las plantas (Fedina y Tsonev, 1997; Farmer, 2001; Faurie et al., 2009). Uno de los posibles papeles del MeJa y objetivo de estudio de este ensayo, fue evaluar el efecto de la adición de MeJa en el medio de cultivo como estrategia para contrarrestar la producción de ROS debida al estrés salino, mediante el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y POD en explantos de patata *Solanum tuberosum* cultivar Kennebec. La producción de ROS provoca daños irreversibles en las células vegetales, principalmente, la peroxidación de lípidos insaturados de la membrana celular, la desnaturalización de las proteínas y la mutación de los ácidos nucleicos (Mittler, 2002; Miller, 2009; Singh Gill y Tuteja, 2010). En este sentido es de gran importancia la búsqueda de compuestos que aplicados de forma exógena permitan incrementar la tolerancia de las plantas a situaciones de estrés, como es el salino.

Para mitigar o hacer frente a la generación de ROS las plantas han desarrollado mecanismos de respuesta mediados por compuestos antioxidantes no enzimáticos, como los flavonoides, y los tocoferoles, entre otros, y enzimáticos, como la catalasa (CAT), la peroxidasa (POD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión reductasa (GPX) y la superóxido dismutasa (SOD), que permiten reducir los niveles de H_2O_2 , O_2^- y OH^- de los tejidos vegetales (Willekens, et al., 1995; Mittler, 2002; Miller, 2009). La expresión de genes que codifican las respuestas antioxidantes es uno de los criterios para la selección de cultivares tolerantes a la salinidad; en este sentido, Joseph y Jini (2011) sugieren la manipulación genética para incrementar las respuestas antioxidantes como una alternativa para reducir el impacto negativo de la salinidad en los cultivos.

Se ha demostrado que la actividad antioxidante de las plantas aumenta en respuesta al estrés salino para proteger y evitar los daños celulares que provocan los altos niveles de ROS que se generan en las células, lo cual permite obtener una mayor tolerancia a la salinidad (Rahnama y Ebrahimzadeh, 2005; Mandhania et al., 2006; Neto et al., 2006).

Sin embargo, otros estudios muestran que la actividad enzimática antioxidante no es la única respuesta a elevados niveles de ROS, sugiriendo que los mecanismos de detoxificación pueden ser varios y diferir entre especies, cultivares e incluso entre estados fenológicos de la planta (Volk y Feierabend, 1989; Hertwig et al., 1992; Streb y Feierabend, 1996; Turhan et al., 2008).

En el presente estudio se observó que la actividad de la CAT solo aumentó ligeramente en los explantos del cultivar Kennebec cultivados *in vitro* y expuestos a concentraciones crecientes de salinidad y en ausencia de MeJa. Estos resultados difieren a los observados por Aghaei et al. (2009) donde la actividad de la CAT aumentó al incrementar el estrés salino a 60mM, pero al aumentar la salinidad a 90mM la actividad de la CAT se redujo significativamente respecto al control en explantos del cultivar de patata Kennebec cultivados *in vitro* durante tres semanas. Otros estudios muestran un aumento de la actividad enzimática de la CAT y la POD bajo condiciones de estrés salino en cultivares de patata tolerantes (Agrida y Kennebec) y sensibles (Diamant y Ajax) a la salinidad (Rahnama y Ebrahimzadeh, 2005). En algodón, *Gosypium sp*, la actividad de la CAT y los niveles de tocoferol se incrementaron significativamente más en las líneas tolerantes al estrés salino frente a las líneas sensibles (Gosset et al., 1994). En trigo, *Triticum sp*, la actividad de la CAT y POD se incrementó con el aumento de la salinidad en cultivares de trigo tolerantes y sensibles a la salinidad; el aumento de la actividad antioxidante fue superior en los cultivares tolerantes (Mandhania et al., 2006).

Nuestros resultados sugieren que bajo las condiciones de cultivo establecidas en este ensayo con el cultivar Kennebec, el aumento de la actividad de la CAT y de la POD en los explantos son mecanismos propios de la planta que permiten reducir eficientemente los niveles de ROS y así mitigar los efectos negativos del estrés salino sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos, lo que tendría relación con la tolerancia del cultivar a la salinidad. La eficacia de la actividad de la CAT y POD en reducir los altos niveles de ROS está estrechamente relacionada con los resultados observados en el capítulo 6 de esta Tesis Doctoral donde el cultivar Kennebec alcanzó el mayor desarrollo y crecimiento de los explantos expuestos a los diferentes niveles de estrés salino respecto al resto de los cultivares evaluados.

Por otra parte, la adición de cualquiera de las concentraciones de MeJa como posible inductor de la respuesta antioxidativa en el medio de cultivo incrementó la actividad de la CAT de los explantos del cultivar Kennebec expuestos a las diferentes concentraciones de salinidad y aún más en ausencia de estrés salino. Bajo las concentraciones salinas entre 30 y 90mM de salinidad la concentración mínima de MeJa ensayada, 10nM, no fue suficiente para incrementar la actividad de la CAT, mientras que las concentraciones de 50 ó 250nM de MeJa aumentaron de forma importante la actividad de la CAT; la concentración máxima de MeJa, 1250nM, también aumentó la actividad de la CAT pero en menor grado que las dos anteriores. En los explantos del cultivar Kennebec cultivados con las concentraciones de MeJa de 50, 250 y 1250nM se observó que la actividad de la CAT fue siempre superior a la observada en el tratamiento control sin MeJa. Nuestros resultados sobre la actividad de la CAT como mecanismo eficaz para la reducción de los niveles altos de ROS soportan a estudios previos que demuestran que el aumento en la actividad de la CAT permite una mayor y rápida eliminación de las ROS (Aghaei et al., 2009), lo cual, se traduce en una mayor tolerancia de los explantos a condiciones salinas. El incremento de la actividad de la CAT debida al MeJa ha sido demostrada por varios investigadores. Jung (2004) demostró que los niveles de CAT aumentaron significativamente, un 58%, siete días después del tratamiento con MeJa 10 μ M en *Arabidopsis thaliana*. En hojas de higuera, *Ricinus communis*, la actividad de la CAT se incrementó 12 horas después del tratamiento con MeJa (1,1mM); a las 24 y 48 horas la actividad disminuyó, posiblemente debido a la estabilización del MeJa en los tejidos de la planta (Martins dos Santos Soares, 2010).

De forma similar a la observada en la CAT pero en unos valores mucho más acusados, la actividad de la POD aumentó cuando los explantos del cultivar Kennebec fueron expuestos al estrés salino. Estudios previos también demuestran un aumento de la actividad de la POD bajo el estrés salino. Daneshmand y Arvin (2010) observaron el aumento de la actividad de la POD en *Solanum stoloniferum*, *Solanum bulbosum* y *Solanum acaule* cultivados *in vitro* y expuestos a un estrés salino de hasta 120mM y determinando en base a la actividad de la enzima la mayor o menor tolerancia al estrés salino. En otras especies vegetales se observó que la actividad de la POD aumenta ante situaciones de estrés como mecanismo de respuesta antioxidante (Jung, 2004; Rahnama y Ebrahimzadeh, 2005; Mandhania et al., 2006; Neto et al., 2006).

Así mismo, la adición de MeJa al medio de cultivo incrementó la actividad de la POD cuando los explantos se cultivaron en ausencia de salinidad. Sin embargo en los explantos expuestos a un estrés salino de 60mM y con las concentraciones de MeJa ensayadas, la actividad de la POD presentó valores similares al tratamiento control sin MeJa, mientras que con 90 y 120mM de salinidad las concentraciones de MeJa redujeron la actividad de la POD. La reducción de la POD con la adición de MeJa fue mayor cuando los explantos estuvieron expuestos a la concentración salina máxima y en este caso con la concentración máxima de MeJa la actividad de la POD fue similar a la observada en el control sin salinidad. Resultados similares han sido observados en berenjena, *Solanum melongena*, en la que la salinidad y la adición de 10 μ M JA incrementó la actividad de la POD y el JA promovió un mayor desarrollo vegetativo respecto al control (Manar et al., 2013). Por otra parte, en semillas de pepino, *Cucumis sativus*, la aplicación de 10 μ M de MeJa incrementó la actividad de la POD y la CAT respecto al control y mostrando una mayor tolerancia al estrés por bajas temperaturas (Li et al., 2012).

Estos resultados obtenidos en el cultivar de patata Kennebec, cultivar clasificado como tolerante a la salinidad, confirman que las variaciones en la actividad enzimática de la CAT y de la POD son mecanismos eficaces para eliminar o reducir los niveles tóxicos de ROS debido al estrés salino. La adición de MeJa provoca un aumento importante de la actividad de la CAT, el cual es relativamente independiente de la concentración salina, sugiriendo que el MeJa promueve una mayor actividad de la CAT para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS. Las concentraciones de 50, 250, 1250nM de MeJa fueron las que promovieron una mayor actividad de la CAT. Son necesarios más estudios para confirmar si las actividades de la CAT y POD están relacionadas entre sí o actúan de forma independiente. También es necesario profundizar en el conocimiento, a nivel genómico, como el propuesto por Joseph y Jini (2011) para identificar genes potenciales relacionados con la actividad antioxidante y su relación con el efecto inductor del MeJa como estrategia para aumentar la tolerancia de los cultivos al estrés salino.

8.5. CONCLUSIONES

- El aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo incrementó la actividad de la CAT en los explantos del cultivar Kennebec.
- La adición de las concentraciones de MeJa incrementaron la actividad de la CAT en los explantos cultivados en ausencia de estrés salino.
- El aporte de las concentraciones de 50, 250 y 1250nM de MeJa al medio de cultivo incrementaron la actividad de la CAT cuando los explantos fueron expuestos a las concentraciones salinas evaluadas.
- El aumento del estrés salino aumentó la actividad de la POD en los explantos del cultivar Kennebec.
- La adición de las concentraciones de MeJa al medio de cultivo incrementaron la actividad de la POD en los explantos cultivados en ausencia de salinidad.
- La aplicación de las concentraciones de MeJa en los explantos expuestos a un estrés salino de 30 y 60mM no mostró variación en la actividad de la POD.
- Todas las concentraciones de MeJa redujeron la actividad de la POD cuando los explantos fueron cultivados con 90 y 120mM de NaCl.

8.6. REFERENCIAS

Aebi, H. 1983. Catalase. En: *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer, H.U. Weinheim, Germany: Verlag Chemie. 273-286p.

Aftab, T; Masroor, M; Khan, A; Idrees, M; Naeem, M; Moinuddin, B y Nadeem Hashmi, N. 2011. Methyl jasmonate counteracts boron toxicity by preventing oxidative stress and regulating antioxidant enzyme activities and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Protoplasma* 248: 601-612.

Aghaei, K; Ehsanpour, A y Komatsu, S. 2009. Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(12):1095-1103.

Amako, K; Cheng, G y Asada, K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* 35(3): 497-504.

Carpin, S; Crevecoeur, M; Greppin, H y Penel, C. 1999. Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in Zucchini. *Plant Physiology* 120: 799-810.

Dasgupta, M, Sahoo, M y Kole, P. 2008. Evaluation of orange sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes for salt tolerant through shoot apex culture under in vitro culture NaCl mediated salinity stress conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94:161-170.

Daneshmand, F y Arvin, M. 2010. Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. *Acta Physiologia Plantarum* 32:91-101.

Farmer, E. E. 2001. Surface to air signals. *Nature* 411: 854-856.

Faurie, B; Cluzet, S y Merillon, J. 2009. Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology* 166: 1863-1877.

Fedina, I. S y Tsonev, T. D. 1997. Effect of pretreatment with methyl jasmonate on the response of *Pisum sativum* to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 151: 735-740.

Foyer, C y Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione peroxidase in chloroplast. A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21-25.

- Fry, S C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. *Annual Reviews Plant Physiology* 37: 165–186
- Gosset, D. R; Millhollon, E. P y Lucas, M. C. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* 34: 706-714.
- Hernández, J; Jiménez, A; Mullineaux, P y Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environment* 23:853-862.
- Hertwig, B; Streb, P y Feierabend, J. 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology* 100: 1547-1553.
- Hilda, P; Graciela, R; Sergio, A; Otto, M; Ingrid, R; Hugo, P. C; Edith, T; Estela, M. D y Guillermina, A. 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation* 41: 149-158.
- Imlay, J. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 57:395-418.
- Joseph, B y Jini, D. 2011. Development of salt stress tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. *Asian Journal of Agricultural Research* 5(1): 17-27.
- Jung, S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 225-231.
- Khan, M y Panda, S. 2002. Induction of oxidative stress in roots of *Oryza sativa* L in response to salt stress. *Biologia Plantarum* 45:625-627.
- Li, D; Guo, Y; Li, Q; Zhang, J; Wang, X y Bai, J. 2012. The pretreatment of cucumber with methyl jasmonate regulates antioxidant enzyme activities and protects chloroplast and mitochondrial ultrastructure in chilling-stressed leaves. *Scientia Horticulturae* 143: 135-143
- Manar, T; Banu, G; Fikret, Y; Sebnem, K; Ozlem, U y Sebnem, E. 2013. The effects of JA treatment on the growth and some enzyme activities of eggplant embryos grow in vitro under salt stress conditions. *Research Journal of Biotechnology* 8(12): 101-106.
- Mandhania, S; Madan, S y Sawhney, V. 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 50(2): 227-231.

- Martins dos Santos Soares, A; Freitas de Souza, T; Jacinto, T; Lima, O y Machado, T. 2010. Effect of Methyl Jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22(3): 151-158.
- Miller, H. 2009. Unravelling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 284: 26485-26492.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, Antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Neto, A; Prisco, J. T; Eneas-Filho, J; Abreu, C. E. B y Gomez-Filho, E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental Experimental Botany* 56: 87-94.
- Nojavan-Asghari, M y Norastehnia, A. 2006. A possible role for Methyl Jasmonate in effecting superoxide dismutase and catalase activities under PQ induces oxidative stress in Maize seedlings. *Journal of Biological Sciences* 6(1):55-60.
- Rahnama, H y Ebrahimzadeh, H. 2005. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings. *Biologia Plantarum* 49:93-97.
- Singh Gill, S. y Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. A Review. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Streb, P y Feierabend, J. 1996. Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. *Botanica Acta* 109: 125-132.
- Turhan, E; Gulen, H y Eris, A. 2008. The activity of antioxidative enzymes in three strawberry cultivars related to salt-stress tolerance. *Acta Physiologia Plantarum* 30: 201-208.
- Volk, S y Feierabend, J. 1989. Photoinactivation of catalase at low temperature and its relevance to photosynthetic and peroxide metabolism in leaves. *Plant Cell and Environment* 12: 701-712.
- Willekens, H; Inze, D; Van Montagu, M y Van Camp, W. 1995. Catalase in plants. *Molecular Breeding* 1:207-228.

9. DISCUSIÓN GENERAL

9. DISCUSIÓN GENERAL

9.1. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVARES DE PATATA

Las áreas con potencial agrícola van disminuyendo con el aumento continuo de la población humana, que ocupa progresivamente más territorio. Este hecho hace que la producción agrícola se desplace hacia áreas con menor potencial y que regularmente son afectadas por factores limitantes para los cultivos, como la sequía, las altas o bajas temperaturas, la salinidad del suelo y del agua de riego. Por esta razón es necesario insistir en la búsqueda de cultivares tolerantes que permitan producir alimentos bajo condiciones limitantes de estrés abiótico y biótico (Ravishankar, 2011).

El cultivo *in vitro* de secciones nodales de especies agrícolas se ha mostrado como una técnica idónea para la caracterización de cultivares en base a su desarrollo vegetativo y radical (Dasgupta et al., 2008; Daneshmand y Arvin, 2010; Rai et al., 2011). El cultivo *in vitro* ha facilitado la caracterización de diferencias fenotípicas entre cultivares de una misma especie cultivados bajo condiciones estrictamente controladas, principalmente de temperatura, fotoperiodo y humedad, y de componentes del medio nutritivo, lo cual ha permitido seleccionar cultivares con las características agronómicas más adecuadas para su cultivo en invernadero y campo (Gopal e Iwama, 2007). Es importante recalcar que se han obtenido resultados de desarrollo, tolerancia y resistencia a factores bióticos y abióticos bajo estrictas condiciones controladas que están altamente correlacionados con la respuesta en condiciones reales de cultivo (Gopal y Minocha, 1998; Iwama y Yamaguchi, 2006; Pérez-Clemente et al., 2006).

Esta técnica no sólo se utiliza frecuentemente para la multiplicación y mejora genética en plantas con interés agronómico, para la conservación de recursos fitogenéticos, para la regeneración de plantas transformadas genéticamente, para la obtención de plantas libres de plagas y enfermedades o para la producción de metabolitos secundarios, sino que también permite realizar estudios fisiológicos, bioquímicos o anatómicos, entre otros (Ranalli et al., 1994; Gopal y Minocha, 1998; Gopal et al., 2002; Donnelly et al., 2003; Gopal et al., 2005). Sin embargo, en el caso de la patata, *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*, aún existe poca información sobre la caracterización de cultivares *in vitro*. Elhag (1991) caracterizó más de 80 genotipos de patata frente al estrés salino tanto en campo como en cultivo *in vitro* y demostró que el sistema de cultivo de secciones

nodales es una herramienta adecuada para realizar un screening de genotipos capaces de desarrollarse en diferentes situaciones de estrés. De igual manera, mediante el cultivo *in vitro* nosotros hemos caracterizado cuatro cultivares de patata de consumo en fresco con diferente ciclo de maduración en base a su desarrollo vegetativo y radical.

Secciones nodales de cada cultivar fueron cultivados en medio MS con 2% de sacarosa, a 20°C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Bajo estas condiciones el cultivar Agata, el más temprano, presentó un mayor desarrollo vegetativo y radical respecto a los cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac. En el cultivar Monalisa el desarrollo vegetativo y radical fue significativamente menor que el observado en el cultivar Agata. Mientras que en el cultivar Kennebec el desarrollo de los explantos fue superior al de los cultivares Monalisa y Red Pontiac e incluso algunas de las variables, como el peso fresco de explanto, el área foliar y el peso seco de las raíces, no mostraron diferencias significativas respecto a las del cultivar Agata. Los explantos del cultivar Red Pontiac fueron los que menor desarrollo vegetativo y radical alcanzaron. Estos resultados son similares a los observados por Gopal e Iwama (2007), y sugieren que el desarrollo vegetativo y radical de los explantos depende de las características genotípicas de cada cultivar y que posiblemente está relacionado con el ciclo de maduración. Así, el cultivar Agata, al poseer el ciclo de maduración más corto, presentó un desarrollo vegetativo y radical más rápido que los cultivares con ciclo de maduración más largo Monalisa, Kennebec y Red Pontiac.

En base al mayor o menor desarrollo vegetativo y radical observado entre los cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac bajo condiciones *in vitro*, estos pueden ser caracterizados en relación a su ciclo de maduración. No obstante, es importante aclarar que la clasificación obtenida bajo estas condiciones de cultivo *in vitro* no coinciden exactamente con la proporcionada por Appacale, (2008) en condiciones de Navarra, debido a que la duración del ciclo de maduración de los cultivares es dependiente de la temperatura y del fotoperiodo. Ello sugiere que el ciclo de maduración de un cultivar puede acortarse si se cultiva bajo condiciones de mayor temperatura y fotoperiodo (Hassanpanah, 2010). Este mismo autor demostró que el cultivar Kennebec cultivado *in vitro* posee un mayor desarrollo y adaptación a condiciones adversas, como el estrés salino, respecto a los cultivares Agria, Caesar, Santé y Satina.

Los explantos del cultivar Red Pontiac presentaron desarrollo vegetativo y radical significativamente menor que el del resto de cultivares evaluados. Estos resultados concuerdan con lo observado por Shaterian et al. (2005), quienes demostraron que los cultivares de patata más tempranos presentan mayor tasa de crecimiento y biomasa que los cultivares más tardíos cultivados bajo condiciones controladas en invernadero. Las diferencias encontradas en el desarrollo vegetativo y radical de los cuatro cultivares de patata, cultivados *in vitro* permitieron caracterizar al cultivar Agata como extra temprano, al cultivar Monalisa como semi tardío, al cultivar Kennebec como semi temprano y al cultivar Red Pontiac como tardío cuando se cultivaron a una temperatura de 20°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Estos resultados también confirman que el cultivo *in vitro* es útil y eficaz como herramienta para la caracterización de cultivares (Elhag, 1991). Esta caracterización será más acertada en la medida en que el cultivo *in vitro* se realice simulando las condiciones climáticas de la región o localidad de donde se pretende realizar el cultivo.

9.2. EFECTO DEL METIL JASMONATO SOBRE EL DESARROLLO DE LOS EXPLANTOS DE PATATA

Las hormonas vegetales son sustancias producidas de forma endógena por la planta y en cantidades muy pequeñas, pero su papel sobre el desarrollo y en la respuesta ante situaciones de estrés biótico y abiótico es de vital importancia para la supervivencia y desarrollo de la planta (Creelman y Mullet, 1997; Kim et al., 2009). Sin embargo, se ha demostrado que al igual que otros compuestos, generalmente componentes estructurales de hongos o bacterias, la aplicación exógena de algunas hormonas vegetales permite activar el sistema de defensa natural de las plantas y protegerlas ante situaciones de estrés biótico y abiótico (Munns y Tester, 2008). En nuestros ensayos evaluamos el efecto de la adición exógena de metil jasmonato (MeJa) al medio de cultivo sobre el desarrollo de explantos de cuatro cultivares de patata. Estudios previos reportan los efectos de la aplicación exógena de JA y MeJa sobre el desarrollo de las plantas (Nojavan-Asghari e Ishizava, 1998; Corbineau et al., 1988; Preston et al., 2002; Toro, 2003; Pelacho y Mingo-Castel, 1991; Nojavan-Asghari y Norastehnia, 2006), así como también sobre la activación del sistema de defensa de las plantas ante situaciones de estrés biótico y abiótico (Howe et al., 1996; McConn et al., 1996; Vijayan et al., 1998;

Rao, et al., 2000; Reymond et al., 2000; Farmer, 2001; Nibbe et al., 2002; Xiao et al., 2004; Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2007; Kim et al., 2009).

La aplicación exógena de jasmonatos provoca cambios a nivel celular que pueden resultar beneficiosos o perjudiciales para el desarrollo vegetativo y radical de las plantas. En función de la concentración éstos promueven el aumento del área foliar, el desarrollo radical y la tuberización o bien, la aplicación de jasmonatos reducen la longitud del sistema radical, la germinación de semillas o la viabilidad del polen, entre otros. El incremento de la concentración de jasmonatos en las células vegetales provoca cambios importantes en su metabolismo, como el incremento de los niveles de compuestos fenólicos, de fitoalexinas y de la actividad enzimática oxidativa (Rao et al., 2000; Nibbe et al., 2002; Xiao et al., 2004; Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2007; Kim et al., 2009). Otros efectos asociados a la aplicación exógena de jasmonatos en plantas incluyen la senescencia, la disminución del crecimiento radical, la inducción de la tuberización, el aumento de longitud de los tallos y el aumento del área foliar (Pelacho y Mingo-Castel, 1991; Martín-Closas, 2007; Norastehnia et al., 2007; Kim et al., 2009; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Los resultados obtenidos en nuestros ensayos, en los que se aplica exógenamente jasmonatos y en concreto del MeJa sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, confirman varios de estos efectos.

La respuesta sobre el desarrollo vegetativo y radical del MeJa aplicado fue independiente del ciclo de maduración del cultivar. La aplicación exógena de MeJa de determinadas concentraciones permitió incrementar la longitud de los explantos, el área foliar, la cantidad de raíces, el peso de las hojas, raíces y del explanto entero en los cuatro cultivares de patata ensayados Agata, Monalisa, Kennebec y Red Pontiac. Por otra parte también se observó que la aplicación exógena de MeJa tuvo siempre, un efecto negativo para todas las concentraciones ensayadas sobre el alargamiento de las raíces. La longitud de los explantos de los cuatro cultivares aumentó progresivamente cuando se cultivaron con concentraciones de 10 y 50nM de MeJa; si bien al incrementar a 250nM de MeJa se observó una cierta saturación en la respuesta. Incluso el tratamiento con 1250nM de MeJa, claramente produjo explantos mayores que los no tratados. Estos resultados corroboran los observados por Pruski et al., (2002) y Zhang et al., (2006).

La aplicación de concentraciones crecientes de MeJa al medio de cultivo permitió de forma general incrementar el peso de los explantos. En todos los cultivares evaluados el área foliar fue mayor en todos los tratamientos con MeJa, aunque la variabilidad obtenida no permitió identificar diferencias significativas. El aumento del área foliar es un efecto asociado a los jasmonatos ya demostrado en varias especies por Martín-Closas et al., (2000) y Martín-Closas, (2007). Adicionalmente, se observó que las hojas de los explantos cultivados con MeJa presentaron síntomas de clorosis de manera similar a la reportada por Zhang et al., (2006). Por otra parte, en los cuatro cultivares la longitud del sistema radical se redujo progresivamente con el incremento de la concentración de MeJa. El efecto negativo sobre la longitud del sistema radical fue demostrado anteriormente en patata por Pruski et al. (2002), Zhang et al. (2006), Norastehnia et al. (2007) y Martín-Closas (2007).

En todos los cultivares la cantidad de raíces aumentó progresivamente con la concentración de MeJa aportada al medio de cultivo. Resultados similares fueron descritos en los cultivares de patata Favorita y Helanwuhua cultivados con 0,1 y 1 μ M de JA (Zhang et al., 2006) y maíz, *Zea mays*, cultivado con 50 y 100 μ M de MeJa (Norastehnia et al., 2007). Este efecto también fue observado por Pruski, (2002) en cultivares de patata expuestos a 2500nM de JA. La determinación del peso seco de los explantos, como variable que permite determinar el efecto del MeJa sobre los explantos, mostró que en los cuatro cultivares de patata las concentraciones de MeJa aumentaron el peso seco. Estos resultados concuerdan con los observados en los cultivares de patata Favorita y Helanwuhua cultivados entre 0,1 y 1 μ M de JA (Zhang et al., 2006) y por Pruski, (2002) en cultivares de patata expuestos a 2500nM de JA.

La aplicación exógena de MeJa aumentó el área foliar de los explantos de los cuatro cultivares de patata, siendo el cultivar Monalisa fue el que menor área foliar desarrolló al final de las cuatro semanas de cultivo. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos aplicando por vía foliar 5,7 y 11,4 μ M de MeJa en alcachofa, *Cynara scolymus*, (Martín-Closas et al., 2004) y en plantas de girasol, *Helianthus annuus*, expuestas a 100 μ M de MeJa (Rowe et al., 2012).

Por otra parte, la reducción en la longitud del sistema radical provocada por la exposición a concentraciones crecientes de MeJa es clara y posiblemente se deba a que los jasmonatos como hormonas vegetales, presentan un antagonismo con el etileno limitando su producción. Otros autores indican que la reducción de la longitud del sistema radical se debe a que los jasmonatos y en especial las oxilipinas, subgrupo de los jasmonatos, activan genes responsables de pérdida de la dominancia apical en las raíces por modificaciones estructurales en la pared celular relacionadas con la calosa y la pectina (Vellosillo et al., 2007). Sun et al. (2009) y Yoon et al. (2009) han demostrado que una concentración de 1000nM de MeJa no inhibe el desarrollo radical primario de plantas de arabis y soja, respectivamente, pero concentraciones superiores provocaron la inhibición de crecimiento primario y promovieron el desarrollo radical lateral.

En nuestros ensayos, el aumento en la cantidad de raíces de los explantos se debe al efecto de la aplicación de MeJa, que provoca un mayor desarrollo radical lateral; posiblemente es una acción directa del MeJa que estimula una rápida diferenciación de los tejidos radicales (Toro, 2003; Sun et al., 2009). Los resultados obtenidos por Sun et al., (2009) y Yoon et al., (2009) demuestran que la aplicación exógena de MeJa induce la expresión de genes relacionados con la síntesis de auxinas que apoyan esta hipótesis, ya que el incremento de los niveles de auxinas favorece la formación de raíces laterales y limita el alargamiento de la raíz principal.

9.3. EFECTO DEL ESTRÉS SALINO EN CULTIVARES DE PATATA

El estrés osmótico causado por la concentración de sales en el suelo y en el agua de riego provoca efectos que reducen el desarrollo y la producción de los cultivos. La salinización de las áreas agrícolas se debe principalmente al uso continuo de fertilizantes y al riego con agua con elevado contenido de sales, siendo este problema más grave en regiones agrícolas áridas y semiáridas. Para que las áreas agrícolas propensas al estrés osmótico continúen siendo productivas, es necesaria la búsqueda de soluciones que permitan mitigar los efectos perjudiciales de la salinidad en los cultivos. La selección de cultivares tolerantes al estrés salino es una de las vías para lograr este objetivo. En nuestros ensayos evaluamos *in vitro* los efectos perjudiciales de la salinidad y la tolerancia al estrés salino en cuatro cultivares de patata.

El efecto del estrés salino sobre los cultivares de patata observados en nuestros ensayos es similar a los reportados por varios autores. El estrés salino es conocido por causar efectos adversos sobre el desarrollo de las plantas incluyendo la disminución de su altura, el peso de hoja, tallo y raíces, y la cantidad de raíces de los explantos (Elkhatib et al., 2004; Flowers, 2004; Pour et al., 2010). De forma general a concentraciones de 100mM de NaCl el crecimiento de las plantas se ve severamente afectado, el enraizamiento y el crecimiento de tallos de los cultivares de patata expuestos a 100mM de NaCl *in vitro* y en condiciones de campo se reduce y en muchos casos es inhibido completamente (Fidalgo et al., 2004; Texeira y Pereira, 2007; Pour et al., 2010).

En nuestros ensayos se determinó la tolerancia al estrés salino en base a varios parámetros de desarrollo que de una u otra forma repercuten en el peso total de los explantos, por lo que se toma este como mayor indicador de la tolerancia a la salinidad. La adición de concentraciones de 0, 30, 60 90 y 120mM de NaCl al medio de cultivo redujo progresiva y significativamente el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata. Sin embargo, la sensibilidad a la salinidad fue diferente entre ellos. Esta respuesta está relacionada con las características genóticas propias de cada uno de los cultivares y quizá también influenciada por la duración del ciclo de maduración.

El estrés salino afectó en mayor porcentaje a los cultivares con ciclo de maduración más corto. El peso seco de los explantos de los cultivares Agata y Monalisa se redujo drásticamente con el incremento de la concentración salina en el medio de cultivo. Con un estrés salino de 30mM el peso seco de estos cultivares se redujo en un 40 y 12%, respectivamente. Al aumentar la concentración de NaCl a 60, 90 y 120mM la reducción del peso seco fue mayor y en el caso del cultivar Agata el desarrollo de los explantos se inhibió prácticamente en su totalidad con cualquiera de estos tres niveles de salinidad. En los cultivares Kennebec y Red Pontiac el peso seco de los explantos se redujo progresivamente con el incremento del estrés salino, pero en menor grado que el observado en los cultivares de ciclo de maduración más corto.

El cultivar Kennebec fue el menos afectado por el estrés salino e incluso mostró un mayor desarrollo cuando se cultivó con 30mM de NaCl, y cuando se aportó 60mM de NaCl prácticamente no se presentaron diferencias en el desarrollo respecto al tratamiento control sin NaCl. En estudios previos, el cultivar Kennebec demostró ser más tolerante al estrés salino que el cultivar Concord (Aghaei et al., 2008).

Las diferencias encontradas en el peso seco de los explantos de los cultivares Agata y Monalisa, Kennebec y Red Pontiac, cultivados *in vitro*, es un indicativo de la mayor o menor tolerancia al estrés salino, indicando así que los cultivares más tolerantes presentan un peso seco mayor que los no tolerantes. Resultados de tolerancia al estrés salino, 90mM de NaCl en patata fueron descritos por Aghaei et al. (2008) en los cultivares de patata tolerante y menos tolerante, Kennebec y Concord, cultivados *in vitro*, sugiriendo así que la respuesta observada frente al estrés salino es dependiente del cultivar. Sin embargo, la duración del ciclo de maduración también puede interferir en el aumento del peso seco ya que los cultivares con ciclo de maduración corto poseen un desarrollo vegetativo y radical más rápido y el efecto negativo de la salinidad es más fuerte respecto a los cultivares de ciclo de maduración más largo. En este sentido, Shaterian et al. (2005) al comparar clones de patata de ciclo de maduración temprano y tardío y expuestos a un estrés salino, no observaron diferencias significativas en el desarrollo vegetativo, pero sí observaron que los clones más tempranos el rendimiento fue menor que en los clones más tardíos.

Por otra parte, se ha demostrado que tanto los cultivares de ciclo de maduración corto y como los de ciclo de maduración más largo acumulan sodio en las hojas como respuesta al estrés salino (Munns y Tester, 2008; Rajendran et al., 2009). Sin embargo, los cultivares tolerantes al estrés salino acumulan menos sodio en sus hojas que los menos tolerantes. Por otra parte la concentración de sodio en las raíces es mayor en los cultivares tolerantes respecto a los menos tolerantes. La mayor concentración de sodio en las raíces es posiblemente el mecanismo de respuesta a la salinidad, mecanismo que evita que el sodio llegue a las hojas y cause la deshidratación, clorosis y senescencia de las hojas; este fenómeno es conocido como tolerancia al estrés salino y que permite que la planta tenga un adecuado flujo de agua interno que permita mantener la transpiración (Pour et al., 2010).

Nuestros ensayos muestran los efectos adversos del estrés salino sobre el desarrollo vegetativo y radical de los explantos, que en general fueron menores en los cultivares Kennebec y Red Pontiac que en los cultivares Agata y Monalisa. La efectividad del sistema *in vitro* observada en este experimento para la selección de cultivares con diferente tolerancia a la salinidad se plantea como una herramienta que permitiría seleccionar los cultivares con potencial tolerancia a la salinidad y otros factores abióticos.

9.4. EFECTO PROTECTOR DEL METIL JASMONATO FRENTE AL ESTRÉS SALINO EN CULTIVARES DE PATATA

El uso de compuestos que permitan a las plantas responder positivamente ante el estrés salino mediante el aumento de la tolerancia es necesario y presenta un uso potencial en la agricultura actual. En nuestros ensayos evaluamos el efecto protector del metil jasmonato (MeJa) ante el estrés salino en cuatro cultivares de patata cultivados *in vitro*.

La respuesta de las plantas a situaciones de estrés biótico y abiótico depende de la activación de sus sistemas de defensa. Estos sistemas involucran diferentes respuestas, como la inducción de compuestos osmoprotectores, entre ellos la prolina que actúa como protector celular ante un estrés salino o hídrico, la eliminación de los iones tóxicos a través de las hojas o la acumulación de iones en las vacuolas y la inducción de genes de defensa que incrementan los niveles de metabolitos secundarios y aumentan la capacidad antioxidante que ayudan a mitigar el daño del estrés.

Los jasmonatos son hormonas vegetales inducidas de forma endógena ante situaciones de estrés biótico y abiótico (Wasilewska et al., 2008; Vlot, 2009). La aplicación exógena de jasmonatos y otras hormonas vegetales, como el ácido salicílico, el etileno o los brasinosteroides, activan los sistemas de defensa de la planta, mostrando un gran potencial de uso en la agricultura para contrarrestar situaciones de estrés biótico y abiótico (Yoon et al., 2009; Del amor y Cuadra-Crespo, 2011). En nuestros experimentos evaluamos el potencial efecto protector del MeJa ante el estrés salino. Cuatro cultivares de patata de diferente ciclo de maduración se cultivaron con concentraciones salinas de 30, 60, 90 y 120mM y a todas ellas se añadió 10, 50, 250 y 1250nM de MeJa. Los resultados obtenidos confirman la acción protectora del MeJa ante el estrés salino. Los explantos de los cultivares evaluados que contenían MeJa en el

medio de cultivo mostraron un incremento en el desarrollo vegetativo y radical aun en condiciones de salinidad. La aplicación exógena de MeJa incrementó el desarrollo vegetativo y radical de los explantos. Estos efectos asociados a la aplicación exógena de MeJa, descritos en el capítulo 4 de esta Tesis Doctoral, concuerdan con estudios realizados por otros autores (Martín-Closas et al., 2000; Pruski et al., 2002; Zhang et al., 2006).

Por otra parte, la salinidad provocó la reducción de la longitud del sistema radical en los explantos de los cuatro cultivares, efecto que fue potenciado con la aplicación exógena de MeJa. Este efecto asociado al estrés salino se debe principalmente a la acumulación de iones que causan un estrés osmótico en el explanto (Munns y Tester, 2008). La reducción de la longitud del sistema radical debida a la aplicación exógena de MeJa se debe a una pérdida de dominancia apical provocada por la expresión de genes que inducen la biosíntesis de auxinas (Sun et al., 2009; Yoon et al., 2009).

El aumento en el desarrollo vegetativo y radical observado tras la aplicación de MeJa posiblemente se debe a la capacidad de este compuesto para promover el aumento de la cantidad de raíces de las plantas. Este efecto puede ser una estrategia importante para la planta para mitigar el efecto negativo del estrés salino, ya que permitiría incrementar y/o mantener absorción de agua y nutrientes necesario para la transpiración (Orozco-Cardenas et al., 2001; Neill et al., 2002; Hung y Kao, 2003).

En nuestros ensayos el mayor desarrollo vegetativo y radical de los explantos expuestos al estrés salino se obtuvo con la aplicación exógena de MeJa a concentraciones de 50 a 1250nM; la concentración de 10nM de MeJa en muchos de los casos no fue suficiente para mitigar los efectos perjudiciales del estrés salino; la respuesta del MeJa es dependiente de la concentración. Zhang et al., (2006), demostraron que concentraciones de JA entre 0,1 y 1 μ M incrementaron el desarrollo vegetativo y radical de los explantos mientras que concentraciones inferiores a 0,1 μ M no causaron efecto alguno.

Por otra parte, el mayor o menor desarrollo vegetativo y radical de los cultivares evaluados frente al estrés salino también dependió en gran parte de las características genotípicas de cada cultivar, como ha sido descrito en estudios previos (Iwama, 1998; Shaterian et al., 2005).

Finalmente, nuestros ensayos demuestran la eficacia del cultivo *in vitro* para el estudio de los mecanismos de respuesta de las plantas expuestas a un estrés abiótico como la salinidad (Dasgupta et al., 2008; Daneshmand y Arvin, 2010). Mediante esta técnica es posible realizar análisis de eficacia de compuestos inductores o activadores de los mecanismos de defensa de las plantas de forma rápida y fiable (Queiros et al., 2007; Dasgupta et al., 2008; Aghaei et al., 2009; Daneshmand y Arvin, 2010; Singh-Gill y Tuteja, 2010; Rai et al., 2011).

9.5. DETERMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE PROLINA COMO INDICADOR DE TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO

El contenido de prolina aumentó gradual y progresivamente con el estrés salino. En el conjunto de los cuatro cultivares la concentración de 30mM de NaCl lo incrementó en un 207%, con 60mM el aumento fue del 512%, con 90mM del 597% y con 120mM del 637%. El aumento del contenido de prolina es un mecanismo de respuesta propio de las plantas frente al estrés salino demostrado previamente en otros cultivares de patata (Fidalgo et al., 2004; Texeira y Pereira, 2007; Aghaei et al., 2008). La planta expuesta al estrés salino acumula prolina, la cual permite mantener un balance iónico en el citoplasma y en las vacuolas, permitiendo así mantener un flujo de agua en la planta y con ello continuar su crecimiento y desarrollo (Hasegawa et al., 2000; Singh et al., 2000; Zhifang y Loescher, 2003). La prolina demostró ser un potencial marcador del estrés salino, observándose que a mayor estrés salino mayor es la acumulación de prolina en los tejidos.

Por otra parte, se observó que la aplicación exógena de MeJa también incrementó el contenido de prolina cuando los explantos fueron cultivados sin estrés salino. Resultados similares han sido observados en cebada, *Hordeum vulgare*, donde el contenido de prolina aumentó con la aplicación de JA 15 μ M (Bandurska et al., 2003). El mayor contenido de prolina relacionado con la aplicación de MeJa posiblemente se debe a que el MeJa activa la expresión de varios genes de la planta relacionados con la respuestas de defensa a situaciones de estrés (Kazan y Manners, 2008). Una de estas respuestas puede estar relacionada con la señal de transcripción de los genes responsables de la síntesis del ABA, hormona vegetal relacionada con la respuesta al

estrés osmótico y que promueve la acumulación de prolina en los tejidos de las plantas (Kim et al., 2009).

En el análisis del estrés salino por cultivar, se observó que en ausencia de NaCl el cultivar Agata presentó el contenido de prolina más alto, seguido por los cultivares Monalisa, Kennebec y Red Pontiac que presentaron valores similares. Al incrementar el estrés salino a 30 y 60mM de NaCl el patrón de respuesta fue similar, mientras que con la aplicación de 90 y 120mM de NaCl el cultivar Agata no pudo ser evaluado debido a su falta de desarrollo. A estas concentraciones salinas evaluadas el contenido de prolina fue mayor en el cultivar Red Pontiac, seguido por el cultivar Monalisa, el cultivar Kennebec presentó el contenido de prolina más bajo. En estudios previos llevados a cabo en patata demuestran que los cultivares con ciclo de maduración más largos presentan una mayor adaptación a condiciones adversas debido a que la duración de las etapas fenológicas son más largas que en los cultivares con ciclos de maduración más tempranos (Iwama, 1998; Shaterian et al., 2005). Shaterian et al. (2005) observaron que los clones de patata de ciclo de duración más largo presentaban mayores niveles de prolina respecto a los más tempranos bajo condiciones de estrés salino 150mM.

El análisis del efecto protector del MeJa frente al estrés salino mostró que cuando los explantos de los cuatro cultivares fueron expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, el contenido de prolina aumentó. En plantas de cebada, *Hordeum vulgare*, tratadas con JA, el contenido de prolina se incrementó (Maslenkova et al., 1992). En soja, *Glicine max*, la aplicación de MeJa incrementó el contenido de prolina (Yoon et al., 2009). Por el contrario la aplicación exógena de MeJa restringe la acumulación de prolina en plantas de colza, *Brassica napus*, expuestas al estrés salino (Huget et al., 2003). Nuestros resultados demuestran que los cultivares, más sensibles al estrés salino, Agata y Monalisa, acumularon más prolina que los cultivares tolerantes, Kennebec y Red Pontiac bajo condiciones de estrés salino de hasta 120mM. El cultivar Kennebec presentó un mayor desarrollo y una menor acumulación de prolina que los más sensibles. Sin embargo estos resultados difieren con otros estudios que indican que altos niveles de prolina están relacionados con los cultivares tolerantes (Verbruggen y Hermans, 2008). La respuesta de la prolina ante el estrés salino puede ser dependiente de la especie y en algunos casos de la variedad sobre la cual se ensaya.

9.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRENTE AL ESTRÉS SALINO

Para mitigar o hacer frente a la generación de ROS las plantas han desarrollado un eficiente sistema de respuesta antioxidante, el cual esta mediado por compuestos antioxidantes no enzimáticos, como los flavonoides o los tocoferoles, entre otros, y enzimáticos, como la catalasa (CAT), la peroxidasa (POD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión reductasa (GPX) y la superóxido dismutasa (SOD), que permiten eliminar los niveles de ROS de los tejidos vegetales (Willekens, et al., 1995; Mittler, 2002; Miller, 2009). Estudios previos han demostrado que la actividad antioxidante de las plantas puede estar relacionada con los niveles endogenos de los jasmonatos, o bien ser inducida mediante la aplicación exógena de compuestos como el MeJa, que activan estos mecanismos de defensa y tambien incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes (Jung, 2004; Wang et al., 2007; Parra-lobato et al., 2009; Martins dos Santos Soares, 2010). Se ha demostrado que la actividad antioxidante de las plantas aumenta en respuesta al estrés salino para proteger y evitar los daños celulares que provocan los altos niveles de ROS que se generan en las células, lo cual permite obtener una mayor tolerancia a la salinidad (Rahnama y Ebrahimzadeh, 2005; Mandhania et al., 2006; Neto et al., 2006).

En el cultivar Kennebec, tolerante a la salinidad, se observó que la actividad de la CAT aumentó ligeramente bajo condiciones de estrés salino de hasta 120mM. La actividad de la CAT aumentó con la aplicación exógena de MeJa tanto en los explantos cultivados con o sin estrés salino. Bajo condiciones de estrés salino superiores a 30mM las concentraciones entre 50 y 1250nM de MeJa permitieron incrementar la actividad de la CAT, concentraciones por de bajo de 50nM de MeJa presentaron una actividad enzimática similar al control sin MeJa. Estos resultados demuestran que la actividad de la CAT es un mecanismo eficaz para la reducción de los niveles altos de ROS (Aghaei et al., 2009), lo cual, se traduce en una mayor tolerancia de los explantos a condiciones salinas y un mayor desarrollo vegetativo y radical. El incremento de la actividad de la CAT debida al MeJa ha sido demostrada por varios investigadores. Jung (2004) demostró que los niveles de CAT aumentaron significativamente, un 58%, siete días después del tratamiento con MeJa 10 μ M en *Arabidopsis thaliana*. En hojas de

higuerilla, *Ricinus comunis*, la actividad de la CAT se incrementó 12 horas después del tratamiento con MeJa (1.1mM); a las 24 y 48 horas la actividad disminuyó, posiblemente debido a la estabilización del MeJa en los tejidos de la planta (Martins dos Santos Soares, 2010).

La actividad de la POD aumentó en los explantos del cultivar Kennebec cultivados bajo estrés salino. Daneshmand y Arvin (2010) observaron el aumento de la actividad de la POD en *Solanum stoloniferum*, *Solanum bulbosum* y *Solanum acaule* cultivados *in vitro* y expuestos a un estrés salino de hasta 120mM para determinar la mayor o menor tolerancia al estrés salino. Otros estudios también respaldan el aumento de la actividad de la POD ante situaciones de estrés como mecanismo de respuesta antioxidante (Jung, 2004; Rahnama y Ebrahimzadeh, 2005; Mandhania et al., 2006; Neto et al., 2006).

La actividad de la POD aumentó cuando los explantos se cultivaron con MeJa y en ausencia de salinidad. La aplicación de MeJa no afectó a la actividad de la POD de los explantos cultivados con hasta 60mM de NaCl, mostrando valores similares a control sin MeJa. Sin embargo, con concentraciones salinas de 90 y 120mM todas las concentraciones de MeJa redujeron la actividad de la POD. La reducción máxima de la POD se observó con la adición de MeJa en la concentración salina máxima de 120mM y presentando valores similares al control sin salinidad. Resultados similares han sido observados en berenjena, *Solanum melongena*, en la que la salinidad y la adición de 10 μ M JA incrementó la actividad de la POD y el JA promovió un mayor desarrollo vegetativo respecto al control (Manar et al., 2013). Por otra parte, en semillas de pepino, *Cucumis sativus*, la aplicación de 10 μ M de MeJa incrementó la actividad de la POD y la CAT respecto al control y mostrando una mayor tolerancia el estrés por bajas temperaturas (Li et al., 2012).

Estos resultados obtenidos en el cultivar de patata Kennebec, cultivar clasificado como tolerante a la salinidad, confirman que las variaciones en la actividad enzimática de la CAT y de la POD son mecanismos eficaces para eliminar o reducir los niveles tóxicos de ROS debido al estrés salino. La adición de MeJa provoca un aumento importante de la actividad de la CAT, el cual es relativamente independiente de la concentración salina, sugiriendo que el MeJa promueve una mayor actividad de la CAT para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS. Las concentraciones de 50, 250, 1250nM

de MeJa fueron las que promovieron una mayor actividad de la CAT. Son necesarios más estudios para confirmar si las actividades de la CAT y POD están relacionadas entre sí o actúan de forma independiente. También es necesario profundizar en el conocimiento, a nivel genómico, como el propuesto por Joseph y Jini (2011) para identificar genes potenciales relacionados con la actividad antioxidante y su relación con el efecto inductor del MeJa como estrategia para aumentar la tolerancia de los cultivos al estrés salino.

9.7. REFERENCIAS

- Aghaei, K; Ehsanpour, A; Balali, G. y Mostajeran, A. 2008. In vitro screening of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars for salt stress tolerance using physiological parameters and RAPD analysis. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 3(2): 159-164.
- Aghaei, K; Ehsanpour, A. y Komatsu, S. 2008. Proteome analysis of potato under salt stress. *Journal of Proteome Research* 7: 4858-4868.
- Aghaei, K; Ehsanpour, A y Komatsu, S. 2009. Potato response to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(12):1095-1103.
- Appacale, 2008. *Consulta cultivares patata de España* [Consulta correo electrónico] 2008.
- Bandurska, H; Stroinski, A. y Kubis, J. 2003. The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes. *Biologia Plantarum* 25(3): 279-285.
- Creelman, R. y Mullet, J. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- Corbineau, F; Rudnicki, R. M. y Come, D. 1988. The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation* 7: 157-169.
- Daneshmand, F y Arvin, M. 2010. Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. *Acta Physiologia Plantarum* 32:91-101.
- Dasgupta, M, Sahoo, M; Kole, P. 2008. Evaluation of orange sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes for salt tolerant through shoot apex culture under in vitro culture NaCl mediated salinity stress conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94:161-170.
- Del Amor, F. M y Cuadra-Crespo, P. 2010. Alleviation of salinity stress in broccoli using foliar urea or methyl-jasmonate: analysis of growth, gas exchange, and isotope composition. *Plant Growth Regulation* 63(1): 55-62.
- Donnelly, D; Coleman, W. y Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research* 80: 103-115.

Elhag, A. Z. 1991. Eignung von in vitro verfahren zur Charakterisierung der Salztoleranz bei Solanum-arten. *Vom Fachbereich Gartenbau der Universitat, Hannover*. 148 p.

Elkhatib, H. A; Elkhatib, E. A; Khalaf-Allah, A. M. y Sharkawy, A. M. 2004. Salt tolerance of four potato cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 27: 1575-1583.

Farmer, E. E. 2001. Surface to air signals. *Nature* 411: 854-856.

Fidalgo, F; Santos, A; Santos, I. y Salema, R. 2004. Effects on long-term salt stress on antioxidant defense systems, leaf water relation and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annual of Applied Biology* 145: 185-192.

Flowers, T. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55(396): 307-319.

Gopal, J; Chamail, A. y Sarkar, D. 2002. Slow growth in vitro conservation of potato germoplasm at normal propagation temperature. *Potato Research* 45: 203-213.

Gopal, J; Chamail, A. y Sarkar, D. 2005. Use of microtubers for slow growth in vitro conservation potato germoplasm. *Plant Genetics Resources Newsletter* 141: 56-60.

Gopal, J. e Iwama, K. 2007. In vitro screening of potato against water-stress mediated throught sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports* 26: 693-700.

Gopal, J. y Minocha, J. L. 1998. Effectiveness of in vitro selection for agronomic characters in potato. *Euphytica* 103: 67-74.

Hasegawa, P; Bresa, R; Zhu, J. y Bohnert, H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

Hassanpanah, D. 2010. Evaluation of potato cultivars for resistance against water deficit stress under in vivo conditions. *Potato Research* 53: 383-392.

Howe, G. A; Lightner, J; Browse, J. y Ryan, C. A. 1996. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8: 2067-2077.

Huget, R; Sulpice, R; Lefort, C; Maerskaick, V; Emery, N y Lather, F.R. 2003. The suppression of osmoinduced proline response of *Brassica napus* L. var. *oleifera* leaf discs by polyunsaturated fatty acids and methyl-jasmonate. *Plant Science* 164: 119-127.

- Hung, K. T. y Kao, C. H. 2003. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Journal of Plant Physiology* 160: 871-879.
- Iwama, K. 1998. Development of nodal and lateral roots in potato under field conditions. *Journal Fac-Agri. Hokkaido. University* 68: 33-44.
- Iwama, K. y Yamaguchi, L. 2006. Abiotic stresses I. En: J. Gopal y K. S.M, edits. *Handbook of potato production, improvement and postharvest management*. New York: Food Products, pp. 231-278.
- Joseph, B y Jini, D. 2011. Development of salt stress tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. *Asian Journal of Agricultural Research* 5(1): 17-27.
- Jung, S. (2004) Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 225-231.
- Kazan, K. y Manners, J. 2008. Jasmonate signaling toward an integrated view. *Plant Physiology* 146:1459-1468.
- Kim, E. H; Park, S. H. y Kim, J. K. 2009. Methyl jasmonate triggers loss of grain yield under drought stress. *Plant Signal. Behaviour* 4: 348-349.
- Li, D; Guo, Y; Li, Q; Zhang, J; Wang, X y Bai, J. 2012. The pretreatment of cucumber with methyl jasmonate regulates antioxidant enzyme activities and protects chloroplast and mitochondrial ultrastructure in chilling-stressed leaves. *Scientia Horticulturae* 143: 135-143
- Manar, T; Banu, G; Fikret, Y; Sebnem, K; Ozlem, U y Sebnem, E. 2013. The effects of JA treatment on the growth and some enzyme activities of eggplant embryos grow in vitro under salt stress conditions. *Research Journal of Biotechnology* 8(12): 101-106.
- Mandhania, S; Madan, S y Sawhney, V. 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 50(2): 227-231.
- Martín-Closas, L. 2007. El papel de los jasmonatos en el desarrollo in vitro e in vivo de la planta de patata *Solanum tuberosum* ssp. L. *Tesis Doctoral. Universidad de Lleida. departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería*. 145p.
- Martín-Closas, L; Sol, S y Pelacho, A.M. 2000. Potential application of jasmonic acid for *Solanum tuberosum* micropropagation. *Acta Horticulturae* 520: 127-133.

- Martín-Closas, L; Toro, F; Calvo, G y Pelacho, A.M. 2004. Effect of MeJa on first developmental stage of globe artichoke. *Acta Horticulturae* 660:185-190.
- Martins dos Santos Soares, A; Freitas de Souza, T; Jacinto, T; Lima, O y Machado, T. 2010. Effect of Methyl Jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22(3): 151-158.
- Maslenkova, L; Miteva, T. y Popova, L. 1992. Changes in the polypeptide patterns of barley seedlings exposed to jasmonic acid. *Plant Physiology* 98: 700-707.
- McConn, M. y Browse, J. 1996. The critical requirement for linolenic acid in pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8: 406-416.
- Miller, H. 2009. Unravelling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 284: 26485-26492.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, Antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Munns, R. y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Neill, S. J; Desikan, R. y Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion on Plant Biology* 5: 388-395.
- Neto, A; Prisco, J. T; Eneas-Filho, J; Abreu, C. E. B y Gomez-Filho, E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental Experimental Botany* 56: 87-94.
- Nibbe, M; Hilpert, B; Wasternack, C; Miersch, O y Apel, K. 2002. Cell death and salicylate- and jasmonate-dependent stress responses in *Arabidopsis* are controlled by single set genes. *Planta* 216: 120-128.
- Nojavan-Asghari, M. e Ishizava, K. 1998. Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in cocklebur seeds. *Journal of Plant Growth Regulation* 17: 13-18.
- Nojavan-Asghari, M y Norastehnia, A. 2006. A possible role for Methyl Jasmonate in effecting superoxide dismutase and catalase activities under PQ induces oxidative stress in Maize seedlings. *Journal of Biological Sciences* 6(1):55-60.

- Norastehnia, R. H; Sajedi, M. y Nojavan-Asghari. 2007. Inhibitory effects of methyl jasmonate on seed germination in Maize (*Zea Mays*): Effect on α -amylase activity and ethylene production. *Genetics Applied to Plant Physiology* 33: 13-23.
- Orozco-Cardenas, M. L; Narvaez-Vasquez, J. y Ryan, C. A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding systemin and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13: 179-191.
- Parra-Lobato, M. C; Fernandez-Garcia, N; Olmos, E; Alvarez-Tinaut, M. C y Gómez-Jiménez, M. C. 2009. Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings, *Environmental and Experimental Botany* 66: 9-17.
- Pelacho, A. M. y Mingo-Castel, A. M. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured in vitro. *Plant Physiology* 97: 1253-1255.
- Pérez, Clemente; Montoliu, R. M; López, Clemente; Arbona, V y Gómez-Cadenas, A. 2006. In vitro tissue culture approaches for the study of salt stress in citrus. *International Conference of Biosaline Agriculture*. 167p.
- Pour, S. M; Majidi, I; Omid, M; Davodi, D y Tehrani, A. P. 2010. In vitro plantlet propagation and microtuberization of meristem culture in some wild and commercial potato cultivars as affected by NaCl. *African Journal of Agriculture Research* 5(4): 268-274.
- Preston, C. A; Betts, H. y Baldwin, I. T. 2002. Methyl jasmonate as an allelopathic agent: sagebrush inhibits germination of a neighboring tobacco, *Nicotiana attenuata*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 2343-2369.
- Pruski, K; Astatkie, T. y Nowak, J. 2002. Jasmonate effects on in vitro tuberization and tuber bulking in two potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) under different media and photoperiod conditions. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 38: 203-209.
- Queirós, F; Fidalgo, F; Santos, I y Salema, R. 2007. In vitro selection of salt tolerant lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum* 51(4):728-734.
- Rai, M; Kalia, R; Singh, R; Gangola, M y Dhawan, A. 2011. Developing stress tolerant plants through in vitro selection. An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71: 89-98.
- Rahnama, H y Ebrahimzadeh, H. 2005. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings. *Biologia Plantarum* 49:93-97.
- Ramakrishna, A. y Ravishankar, A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11): 1720-1731.

- Ranalli, P; Ruaro, B G; Delre, P; Dicadilo, M y Mandolino, G. 1994. Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Research* 37: 383-391.
- Rajendran, K; Tester, M. y Roy, S. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell and Environment* 32(3): 237-249.
- Rao, M. V; Lee, H; Creelman, R. A; Mullet, J. E y Davis, K. R. 2000. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633-1646.
- Ravishankar, G. A y Ramakrishna, A; 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling and behavior* 6(11): 1720–31.
- Reymond, P; Weber, H; Damond, M. y Farmer, E. E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-720.
- Rowe, H; Ro, D y Rieseberg, L. 2012. Respons of sun flower (*Helianthus annuus* L.) leaf surface defenses to exogenous MeJa. *PLoSone* 7(5):1-11.
- Schilmiller, A. L. y Howe, G. A., 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinions in Plant Biology* 8: 369-377.
- Shaterian, J; Waterer, D; De Jong, H. y Tanino , K. K. 2005. Differential stress responses to NaCl salt application in early and late maturing diploid potato (*Solanum* sp.) clones. *Environmental Experimental Botany* 54: 202-212.
- Singh, S.K; Sharma, H. C; Goswami, A. M; Datta, S. P y Singh, S.P. 2000. In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biologia Plantarum* 43: 283-286.
- Sun , J; Xu, Y; Jiang, H; Chen, Q; Liu, F; Zhou, W; Chen, R; Li, X; Tietz, O; Wu, X; Cohens, J; Palme, K y Li, C. 2009. *Arabidopsis* ASA1 Is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 21: 1495-1511.
- Telesiński, A; Nowak, J; Smolik, B; Dubowska, A y Skrzypiec, N. 2008. Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Journal Elemental* 13: 401-409
- Texeira, J. y Pereira, S. 2007. High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 60: 121-126.

- Toro, F. J. 2003. Efecto de los jasmonatos en el desarrollo in vitro e in vivo de especies hortícolas. *Tesis doctoral. Universitat de Lleida. Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería*. 141p.
- Vellosillo, T; Martinez, M; Lopez, M.A; Vicente, J; Cascón, T; Dolan, L; Hamberg, M y Castresana, C. 2007. Oxilipins produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* 19: 831-846.
- Verbruggen, N. y Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: A Review. *Aminoacids* 35: 739.
- Vijayan, P; Shockey, J; Lévesque, C. A; Cook, R. J y Browse, J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academic Sciences* 95: 7209-7214.
- Vlot, A. C; Dempsey, D. M. y Klessig, D. F. 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Wang, S; Bowman, L y Ding, M. 2007. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry* 107: 1261–1269.
- Wasilewska, A; Vlad, F; Sirichandra, C; Redko, Y; Jammes, F; Valon, C; Frey, N. F y Leung, J 2008. Update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant* 1: 198-217.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annual Botany* 100: 681-697.
- Willekens, H; Inze, D; Van Montagu, M. y Van Camp, W. 1995. Catalase in plants. *Molecular Breeding* 1:207-228.
- Xiao, S; Dai, L; Liu, F; Wang, Z; Peng, W y Xie, D. 2004. COS1: An *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 16:1132-1142.
- Yoon, J. Hamayun, M., Lee, S. y Lee, I. 2009. Methyl jasmonate alleviating salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science Biotechnology* 12(2): 63-68.
- Zhang, Z. J; Zhou, W. J; Li, H. Z; Zhang, G.Q; Subrahmanitan, K y Yu, Q. J. 2006. Effect of Jasmonic acid on in vitro explant growth and microtuberization in potato. *Biologia Plantarum* 50(3): 453-456.

Zhifang, G. y Loescher, W. 2003. Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induce biosynthesis of both mannitol and glucosyl-mannitol dimmer. *Plant Cell Environment* 26: 275-283.

10. CONCLUSIONES GENERALES

10. CONCLUSIONES GENERALES

- El cultivar Agata fue el que mayor desarrollo vegetativo y radical alcanzó y bajo las condiciones de cultivo de esta tesis se caracterizó con un ciclo de maduración extra temprano.
- El cultivar Monalisa presentó un menor desarrollo vegetativo y radical y se caracterizó con un ciclo de maduración semi tardío.
- El cultivar Kennebec presentó un desarrollo vegetativo y radical inferior al cultivar Agata y superior a Monalisa, este cultivar se caracterizó con un ciclo de maduración semi temprano.
- El cultivar Red Pontiac fue el que menor desarrollo vegetativo y radical presentó y se caracterizó con un ciclo de maduración tardío.
- La aplicación exógena de MeJa promueve el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de patata cultivados in vitro.
- Las concentraciones de MeJa de 10, 50, 250 y 1250nM incrementan el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de patata; la respuesta observada es dependiente del cultivar y de la concentración de MeJa.
- La aplicación exógena de MeJa incrementó la cantidad de raíces y el área foliar de los explantos de patata evaluados.
- El estrés salino redujo el desarrollo vegetativo y radical de los explantos de los cuatro cultivares de patata.
- El desarrollo vegetativo y radical del cultivar con ciclo de maduración más corto, Agata, es el más afectado por el estrés salino, mientras que los cultivares de ciclo de maduración más largo presentaron una mayor adaptación al estrés salino.

- El cultivar Kennebec es el más tolerante al estrés salino, seguido por los cultivares Red Pontiac y Monalisa.
- La aplicación exógena de MeJa produjo un efecto protector frente al estrés salino en los cultivares de patata evaluados, permitiendo incrementar el desarrollo vegetativo y radical de los explantos cultivados en condiciones de salinidad.
- La aplicación exógena de MeJa bajo condiciones de estrés salino incrementó la longitud de explanto, peso fresco y seco, área foliar y cantidad de raíces en los explantos.
- El MeJa redujo la longitud del sistema radical de los explantos pero incrementa la cantidad de raíces.
- La concentración mínima de MeJa utilizada, 10nM, no fue suficiente para mitigar los efectos negativos del estrés salino; las concentraciones superiores, de hasta 1250nM, de MeJa si permitio incrementar la tolerancia al estrés salino.
- El contenido de prolina en los explantos aumentó progresivamente con el aumento de la salinidad.
- La aplicación exógena de MeJa incrementó los niveles de prolina en los explantos de todos los cultivares cultivados en ausencia de estrés salino.
- El cultivar Kennebec fue el que menor contenido de prolina presentó, lo cual está relacionado con su mayor tolerancia al estrés salino.
- El estrés salino incrementó ligeramente la actividad de la CAT en el cultivar Kennebec.
- La aplicación exógena de MeJa entre 10 y 1250nM incrementó la actividad de la CAT en el cultivar Kennebec con y en ausencia de estrés salino.

- La salinidad aumentó la actividad de la POD en los explantos del cultivar Kennebec.
- El estrés salino de hasta 30mM no incrementó la actividad de la POD en el cultivar Kennebec.
- La aplicación exógena de MeJa no incrementó la actividad de la POD en los explantos cultivar Kennebec cultivados hasta con 60mM de NaCl.
- La actividad de la POD se redujo con la aplicación exógena de MeJa cuando los explantos fueron expuestos a 90 y 120mM de NaCl.

La salinidad es un factor limitante para la producción agrícola especialmente en la regiones áridas y semiáridas del planeta, la salinidad disminuye severamente el desarrollo vegetativo, radical y las cosechas de los cultivos. La caracterización *in vitro* de cultivares con mayor tolerancia el estrés salino es necesaria para garantizar la producción y abastecimiento de los productos agrícolas. Así mismo la evaluación de compuestos, como el metil jasmonato, con capacidad de incrementar la tolerancia de las plantas expuestas a situaciones de estrés biótico y abiótico, y en este caso el estrés salino, son una alternativa útil para mitigar o al menos disminuir el impacto negativo de la salinidad sobre el desarrollo, crecimiento y producción de los cultivos.