



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DEL ESTRES POR CALOR SOBRE LA ACUMULACION DE α -SOLANINA, α -CHACONINA, SOLANIDINA Y EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN TUBERCULO DE PAPA (*Solanum tuberosum*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

NORMA A. CORIA GIL

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JORGE I. SARQUÍS RAMÍREZ

0038
006

2000

28/05/14



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Efecto del estrés por calor sobre la acumulación de a-solanina, chaconina, solanidina y el metabolismo de carbohidratos en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*).

Se analizaron tres clones contrastantes en susceptibilidad al estrés térmico: Atlantic como clon susceptible a calor, DFO-33 como tolerante y LT-7 con características intermedias entre estos dos clones. Bajo estrés térmico, el tejido de tubérculo de Atlantic aumenta la concentración de alcaloides, DFO-33 la disminuye mientras que LT-7 no presenta un patrón claro. La adición de alcaloides exógenos al medio de incubación del tejido incrementa el daño sobre la respiración al provocado por el choque térmico, su efecto sobre la permeabilidad de la membrana parece depender de la estabilidad de ésta, de tal forma que membranas con goteo iónico elevado son más susceptibles a los alcaloides. La adición de calcio al medio de incubación disminuye el daño provocado por el estrés térmico o adición de alcaloides. Independientemente del clon que se trate, el choque térmico propicia la degradación de almidón pero incrementa los niveles de Pi. Bajo las mismas condiciones, los azúcares libres disminuyen a excepción de LT-7 en el cual se incrementan; esto correlaciona con el mayor daño a nivel de respiración que sufre este clon por efecto del calor.

Se discute el posible papel de los alcaloides como parte del sistema de regulación de la permeabilidad de la membrana en la economía energética (almidón) mediante cambios en la compartimentalización celular del Pi.

Three potato clones differing in heat resistance were used in this work: Atlantic, heat susceptible, DTO-33 heat resistance and LT-7 intermediate. Under conditions of elevated temperature tuber tissue from Atlantic showed increased alkaloid concentration, in contrast, DTO-33 showed reduced levels and LT-7 did not show a clear pattern of variation with respect to the same parameter. Addition of exogenous alkaloids to incubation medium aggravated the damage caused by heat alone on respiration, while their effect on membrane permeability characteristics seemed to be membrane stability dependant. In turn, membrane stability was highly genotype specific. In all cases, higher ionic leakage correlated with high heat susceptibility. Addition of calcium to incubation medium had a beneficial effect, as it clearly reduced damage caused by heat or alkaloid addition. Regardless of the genotype, heat shock promoted starch degradation and increased levels of Pi. Under the same conditions, free sugars decreased in concentration except in LT-7, in which case they actually increased, this correlated well with the more severe damage on respiration experienced by this clone under heat stress. The possible role of alkaloids in the regulatory system of cell membrane permeability, on energy economy of the cell (starch) by means of changes in Pi compartmentalization within the cell is discussed.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal (UBIPRO) de la ENBP-I, UNAM. Con el apoyo de: DGAPA: Proyecto No. IN204279, Beca de DGEP Escuela de Biología de la ENBP-I

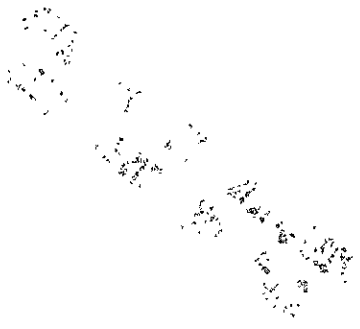
Agradezco la participación de: Dra. Cristina Pérez Amador, Dr. Ignacio Peñaloza, M.C. Ernesto Aguirre, M.C. J. Carmelo Benítez, M.C. César Flores y Maestra Josefina Medrano

Por compartir conmigo la experiencia que les ha dado la vida

Dedico esta tesis por la confianza y apoyo que me brindaron en todo momento

(Dr. Jorge Sarguis y M.C. Martha Urzúa)

A Jorge y Martha



ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	6
Biosíntesis de alcaloides	7
Alcaloides de <i>Solanum tuberosum</i>	8
Toxicidad	11
Actividad sinérgica de los alcaloides	13
Interacción de los alcaloides con la membrana	14
Papel de los GAs en la resistencia a hongos e insectos	16
Efecto de temperaturas supraóptimas sobre el desarrollo de la papa	18
a) Acumulación de GAs inducida por calor	19
b) Metabolismo de carbohidratos bajo estrés por calor	19
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
VI. METAS ESPECÍFICAS	25
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	26
Reactivos	26
Material biológico	26
Condiciones de cultivo	27
Toma de muestras	28
Experimentos con estrés por calor	29
Tratamiento del tejido con alcaloides o calcio	30
Montaje de la técnica para la cuantificación de alcaloides	30
Análisis cuantitativo de alcaloides en tubérculos de papa	32
Cuantificación de fósforo inorgánico (Pi)	33
Cuantificación de azúcares y almidón	34
Obtención de amiloplastos a partir de protoplastos	35
Western blot (SGT)	38
Northern blot (SGT)	39

VIII. RESULTADOS	42
Selección de clones	42
Efecto de la temperatura sobre la permeabilidad de la membrana celular	44
Respiración bajo estrés térmico	47
Efecto del calcio sobre la permeabilidad de la membrana	49
Efecto del calcio sobre la respiración	51
Efecto de los alcaloides sobre la respiración	53
Efecto de la adición de alcaloides en tejido de tubérculo sujeto a estrés por calor	55
Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre la permeabilidad de membrana	54
Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre la respiración	58
Goteo iónico en tejido almacenado por diferentes periodos de tiempo	58
Concentración de alcaloides endógenos	62
Concentración de fósforo inorgánico	64
Efecto del estrés térmico sobre la concentración de azúcares y almidón	66
IX. DISCUSIÓN	68
X. CONCLUSIÓN	81
XI. BIBLIOGRAFÍA	82

FIGURAS

3.1 Síntesis de alcaloides de papa	9
3.2 Partición del carbono en tubérculos de papa	20
7.1 Protoplastos de tubérculo de papa	37
7.2 Amiloplastos de tubérculo de papa	38
7.3 Western blot (SGT)	40
8.1 Selección de clones mediante goteo iónico	43
8.2 Goteo iónico bajo estrés por calor a diferentes intervalos de tiempo	45
8.3 Efecto de la temperatura sobre permeabilidad de membrana	46
8.4 Efecto de la temperatura sobre la respiración	47
8.5 Efecto del calcio sobre permeabilidad de membrana	50
8.6 Curvas de dosis-respuesta para el efecto del calcio sobre la respiración	52
8.7 Efecto del calcio sobre la respiración en tejido incubado a temperaturas supraóptimas	53
8.8 Curvas de dosis-respuesta para el efecto de los alcaloides sobre la respiración	54
8.9 Efecto de los alcaloides sobre la respiración en tejido incubado a temperaturas supraóptimas	56
8.10 Concentración endógena de alcaloides	63
8.11 Concentración endógena de fósforo inorgánico	65
8.12 Concentración endógena de almidón, azúcares y alcaloides	68

CUADROS

3.1 Alcaloides reportados en plantas de papa comercial	10
3.2 Contenido de GAs totales en diferentes partes de la papa	11
7.1 Medio de digestión para la obtención de protoplastos	36
7.2 Medio de lavado para protoplastos	36
8.1 Porcentaje de daño en la permeabilidad de membrana y respiración	49
8.2 Efecto de la adición de alcaloides sobre la respiración a diferentes intervalos de tiempo	55

8.3 Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre permeabilidad de membrana	57
8.4 Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre la respiración	59
8.5 Permeabilidad de membrana en tubérculos almacenados durante diferentes periodos de tiempo	61
8.6 Concentración de azúcares libres y almidón	66

I. RESUMEN

El trabajo aquí descrito es parte de un esfuerzo que se viene realizando en la UNAM desde 1994, por documentar los aspectos más relevantes de la fisiología de la planta de papa (*S. tuberosum*) en condiciones de temperatura supraóptima, con el objetivo de adaptar el cultivo de esta especie a zonas de clima semicálido en nuestro país. Así, se analizó el efecto del estrés térmico sobre tejido de tubérculo de papa de tres clones (Atlantic, LT-7 y DTO-33) contrastantes en tolerancia al calor. Los resultados mostraron que la incubación del tejido a temperaturas supraóptimas incrementa la permeabilidad de membrana e inhibe la respiración. Sin embargo se encontraron diferencias clonales; por ejemplo, la incubación del tejido a 35°C durante 4h incrementó la permeabilidad celular de Atlantic en 63%, en LT-7 40% y 12% en DTO-33 respecto a los controles; mientras que, la inhibición de la respiración bajo las mismas condiciones fue de 46%, 80% y 52%, respectivamente. La adición de calcio 5mM al medio de incubación del tejido disminuyó la permeabilidad de membrana del tejido estresado en 55%, 25% y 35% en Atlantic, LT-7 y DTO-33, respectivamente, en tanto que la respiración se recuperó en 46%, 5% y 7%, respectivamente. La adición de alcaloides inhibió la respiración 55%, 14% y 25% en Atlantic, LT-7 y DTO-33, respectivamente; así mismo, incrementó la inhibición de la respiración debida al estrés térmico en 26% en el caso de Atlantic y DTO-33, pero no tuvo efecto sobre LT-7. En el caso de tejido fresco el efecto de la adición de alcaloides fue diferente: más que daño sobre la permeabilidad de la membrana y la respiración, se observó una tendencia a la normalización de estas propiedades.

La extracción y cuantificación de alcaloides en tejido de tubérculo mostró que la

concentración de alcaloides totales disminuyó con el tiempo de almacenamiento. En Atlantic bajó de 19 a 14 mg/100g de tejido durante 9 meses de almacenamiento; en cambio, en LT-7 la disminución fue de 23 a 18 y en DTO-33 de 23 a 10 mg/100g de tejido. El estrés aumentó los alcaloides totales en 5 mg/100g en Atlantic; en LT-7 se incrementó 8.6 mg/100g de tejido y en DTO-33 disminuyeron gradualmente alrededor de 50%. En cuanto a la α -chaconina se observó un notable incremento bajo estrés térmico, 4.5 mg/100g en LT-7, y de 5.0 mg/100g en Atlantic; pero en DTO-33 hubo una disminución de 5.0 mg/100g de tejido. La concentración de fósforo inorgánico (Pi) fue diferente en los 3 clones; por ejemplo, la concentración media más baja se registró en LT-7 (4.7 μ moles/g de tejido) y la más alta se observó en DTO-33 (7.6 μ moles/g de tejido). El tiempo de almacenamiento incrementó la concentración de Pi y en menor grado el estrés térmico. En el primer mes de almacenamiento bajo estrés se registró un incremento respecto al control de 1.0 μ moles/g de Pi en Atlantic, 3.1 μ moles/g en LT-7 y 1.3 μ moles/g en DTO-33. La concentración de azúcares y almidón no cambió significativamente en el tejido de tubérculos estresados a 35°C durante 4h; por tal motivo se mantuvo el estrés durante 24h a la misma temperatura; en este caso se observaron diferencias clonales en la concentración de almidón a temperatura ambiente. La concentración más elevada de almidón se observó en Atlantic (45% de tejido fresco) y la más baja en DTO-33 (30% de tejido fresco) el estrés disminuyó los niveles en 17, 19 y 12% respecto al control en Atlantic, LT-7 y DTO-33, respectivamente. La concentración total de azúcares libres disminuyó ligeramente en Atlantic y DTO-33, mientras que en LT-7 se incrementó ligeramente. La concentración endógena de alcaloides totales disminuyó invariablemente con el estrés; sin embargo, en DTO-33 se registró 8.8 mg/100g de alcaloides totales menos que en el control; en cambio, en Atlantic solamente bajó 2.3 mg/100g de tejido respecto al control; en LT-7 los valores

fueron intermedios.

A partir de la evidencia reunida y su contraste con la literatura, se llegó a un modelo teórico que se propone como hipótesis de trabajo para explicar las relaciones entre azúcares solubles, almidón, glicoalcaloides y Pi en tubérculo de papa sujetos a estrés por calor. De acuerdo con este modelo, se propone que la tolerancia del tejido de tubérculo a temperaturas supraóptimas depende de la capacidad del tejido para mantener estables la permeabilidad de membrana y la respiración bajo estas condiciones. La adición de calcio al medio de incubación del tejido protege al tejido bajo condiciones de estrés en estos dos aspectos; en cambio, la adición de alcaloides a temperatura ambiente reproduce el efecto del estrés térmico. La estabilidad de la membrana parece depender de la capacidad del tejido de disminuir la concentración de alcaloides endógenos, principalmente de α -chaconina. En el modelo, el genotipo es un determinante de la concentración de Pi y almidón en condiciones normales. La temperatura elevada no parece inducir cambios importantes en la concentración total de Pi, pero sí provoca una reducción sustancial del contenido de almidón del tubérculo, independientemente del genotipo. Aparentemente, los cambios en permeabilidad de membrana inducido por la temperatura elevada se traducen en cambios en el patrón normal de compartimentalización del Pi, que a su vez, promueven la degradación del almidón; esta llevaría a un mayor aporte de sustrato para la respiración, lo cual contribuiría con el suministro energético adicional que demandan las actividades metabólicas de prevención y reparación de los daños por calor.

II. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) se desarrolla en óptimas condiciones en climas templados, entre 17 y 21°C, fotoperiodos cortos y alta humedad relativa. El ciclo completo dura aproximadamente 110 días y la tuberización se inicia alrededor de los 2 meses. En nuestro laboratorio, al igual que en otras partes del mundo con climas tropicales, estamos interesados en introducir el cultivo en regiones de clima semicálido. Esto implica superar algunas limitantes que le restan calidad a la papa en estos ambientes; entre las más importantes se encuentran: el endulzamiento del tubérculo, la disminución de almidón (Sowokinos, 1990) y la acumulación de glicoalcaloides (GAs). Los principales GAs de la papa son la α -solanina y la α -chaconina, ambos se sintetizan por la ruta del mevalonato vía colesterol; están formados por un núcleo esteroidal común que es la solanidina, la cual es glicosilada con solatriosa o chacotriosa respectivamente (Stapleton et al., 1991). Aún cuando la síntesis de GAs está genéticamente determinada, su acumulación está notablemente influenciada por las condiciones ambientales durante el desarrollo o almacenamiento de la papa (Currier y Kuc, 1975). Estos compuestos han sido interpretados como factores de resistencia naturales y son utilizados en programas de fitomejoramiento avocados a la transferencia de resistencia a patógenos en clones comercialmente importantes de *Solanum*. Se ha sugerido que su toxicidad se debe a la capacidad que tienen los GAs de formar complejos con la fracción lipídica de la membrana de las células de los patógenos (Roddick y Rijnenberg, 1986). Sin embargo, los humanos han resultado ser los mamíferos más sensibles a la toxicidad de estos compuestos, por lo cual se recomienda no consumir tubérculos con una concentración mayor a 20 mg/100g de tejido fresco.

Por otra parte, la acumulación de azúcares que puede acompañar a la de GAs le resta calidad industrial al tubérculo debido a la reacción de Maillard, en la que el aldehído de los azúcares reacciona con el grupo amino de los aminoácidos libres formando un color negro indeseable durante la fritura.

Este trabajo fue diseñado para documentar el efecto que tiene la temperatura elevada sobre algunos aspectos del metabolismo de los tubérculos de papa que repercuten en su aceptación comercial desde el punto de vista de la salud humana.

A partir de una pequeña muestra de germoplasma se seleccionaron 3 clones que representan una amplia variedad en la respuesta del tejido de tubérculos maduros al estrés de temperatura elevada. Una vez hecha la selección de clones, se diseñaron experimentos encaminados a documentar la respuesta del tejido de tubérculo a la temperatura elevada a nivel de propiedades de membrana celular, así como a nivel metabólico general.

Posteriormente se hicieron experimentos para demostrar:

- 1) La acumulación de alcaloides inducida por exposición a calor.
- 2) El efecto atenuante del calcio sobre el daño inducido por calor.
- 3) La reproducción de los daños inducidos por calor mediante la aplicación exógena de un nivel fisiológico de una mezcla de alcaloides.
- 4) Alteraciones en niveles endógenos de Pi por efecto del calor.

Por último, se realizaron algunos estudios preliminares de obtención de protoplastos y amiloplastos para diseñar un sistema experimental que investigaciones subsecuentes podrán utilizar para estudiar con más detalle el involucramiento de las modificaciones en propiedades de membrana y la concomitante alteración de rutas metabólicas bajo estrés por calor.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

Los tubérculos de papa son una excelente fuente de carbohidratos y tienen un contenido significativo de fósforo, potasio, calcio y vitaminas, especialmente vitamina C. El contenido de proteína rebasa el 10% de la materia seca, porcentaje comparable al 11% reportado para el trigo (Jadhav y Salunkhe, 1975). Además, la papa provee de una excelente fuente de lisina, pero es baja en aminoácidos sulfurados (cisteína y metionina). Con el creciente interés en la papa y sus productos, fitomejoradores y genetistas continuamente están tratando de mejorar la resistencia de la planta a enfermedades, así como la producción, calidad y propiedades de procesamiento de cultivares comerciales mediante su cruzamiento con especies de papas silvestres, o alterando los patrones genéticos a través de técnicas de biología molecular.

La familia de las solanaceas y en particular el género *Solanum*, sintetiza una gran variedad de alcaloides, los cuales contienen nitrógeno en sus anillos esteroideos. Los alcaloides generalmente se encuentran en forma de glicósidos y por tanto son glicoalcaloides (GAs). Al menos 90 estructuras diferentes de GAs han sido aisladas y caracterizadas en 300 especies de *Solanum* y 30 en *S. tuberosum* (Prelog y Jäger, 1953-1960, citado por Friedman y McDonald, 1997).

Los principales GAs en cultivares de papa comercial son la α -solanina y la α -chaconina. Estos compuestos fueron detectados en bioensayos dirigidos a determinar la estructura y la concentración de las principales estructuras químicas involucradas en los mecanismos de resistencia, producidas en la cáscara de tubérculo de papa contra *Helminthosporium carbonum* (Allen y Kúc, 1968); han sido interpretados como factores de resistencia

naturales y utilizados en programas de fitomejoramiento avocados a la transferencia de resistencia a patógenos en clones comercialmente importantes de *Solanum* debido a sus propiedades fungicidas y pesticidas. El consumo de tubérculos de papa con concentraciones altas de GAs ha llegado a ser letal en humanos. De tal forma que deben tomarse precauciones en la producción de nuevas variedades de papa para que los niveles de alcaloides no representen un problema de salud cuando se consuman. Son sorprendentes las cifras que citan Friedman y McDonald (1997) sobre la gran susceptibilidad de los humanos a los alcaloides de la papa; por ejemplo, reportan que la LD₅₀ (dosis letal) para la α -solanina es de 1000 mg/kg en ratones a los que se les suministró en forma oral; en contraste, usando inyección intraperitoneal (IP) la LD₅₀ fue de 34 mg/kg. La LD₅₀ para otros animales varía entre 30 y 60 mg/kg cuando se suministra IP (simios, cerdos, monos, conejos, ratones, etc.). Estos valores son considerablemente más altos a los estimados como dosis letal oral de 10 mg/kg en humanos. Experimentos realizados han mostrado que los hamsters son tan sensibles como los humanos a la α -solanina y la α -chaconina, por lo que se recomienda utilizarlos para evaluar la toxicidad de estos compuestos en los programas de salud.

Biosíntesis de alcaloides

La α -solanina y la α -chaconina se sintetizan por la ruta del mevalonato vía colesterol; están formados por un núcleo esteroidal común que es la solanidina, la cual es glicosilada con solatriosa y chacotriosa respectivamente (Stapleton et al., 1991). Históricamente, la solanina fue el primer alcaloide aislado (Baumann, 1843) y reconocido como glicósido por Zwenger y Kind en 1861, (citados por Friedman y McDonald, 1997).

Los niveles de estos compuestos están genéticamente determinados; sin embargo, factores

ambientales influyen sobre la acumulación de los GAs de la papa tales como: temperaturas no óptimas (Currier y Kuc, 1975; Linnemann et al., 1985), luz (Maine et al., 1988; Deahl et al., 1991), daños mecánicos (Fitzpatrick et al., 1977) y presencia de patógenos (Allen y Kuc, 1968).

La biosíntesis de alcaloides ha sido discutida en detalle por Shih y Kuc (1973), Heftman (1983), Burden et al. (1989) y Bergenstrahle (1996). Los alcaloides se sintetizan a partir del acetato que reacciona con la coenzima A para formar los intermediarios ácido mevalónico, escualeno, lanosterol, cicloartenol y finalmente colesterol.

La vía exacta para la conversión de colesterol a GAs no ha sido completamente demostrada. Friedman y McDonald (1997) citan la posible ruta de síntesis (Fig. 3.1).

Alcaloides de Solanum tuberosum

La α -solanina, α -chaconina y solanidina representan el 90% de los alcaloides totales en la papa; sin embargo, se han reportado varios alcaloides adicionales que incluyen al tomatidenol, acetileptidina, tomatidina, demissidina, solasodina y sus respectivas formas glicosiladas. Los azúcares que se unen a los diferentes aglicanos (porción esteroideal de los alcaloides) se muestran en la tabla 3.1 (Gregory, 1984; Jenifer, 1987; Friedman y Dao, 1992).

Algunos de los GAs anteriormente detectados en tubérculos comerciales han sido transmitidos de especies silvestres a los híbridos resultantes de cruza sencilla (4X x 4X). Las especies silvestres más ampliamente utilizadas para la transferencia de genes involucrados en la resistencia a patógenos son las siguientes: *S. Demissum*, que sintetiza grandes cantidades de tomatidenol y demissidina, *S. Vernei*, que presenta altos niveles de los glicósidos de solanidina, solasodina y tomatina (van Gelder y Scheffer, 1991).

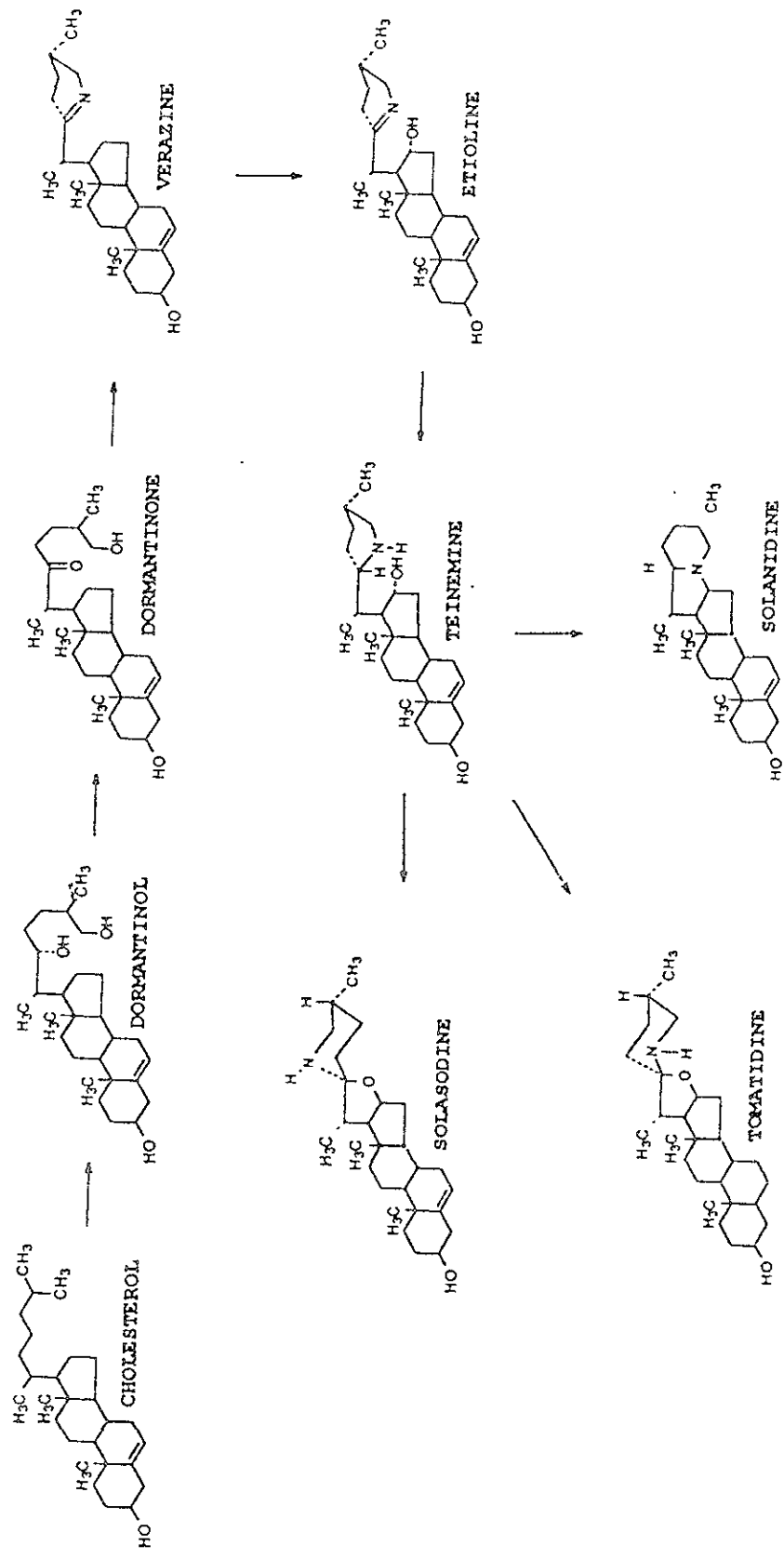


Figura 3.1 Posible vía biosintética del colesterol a los aglicanos en *S. Tuberosum*. Tomada de Friedman y McDonald (1997).

S. chacoense, que acumula altas concentraciones en leptina I y II, formas acetiladas de chaconina y solanina (Deahl et al., 1991).

Cuadro 3.1 Alcaloides reportados en plantas de papa comercial. Tomado de Gregory (1984), Jenifer (1987) y Friedman y Dao (1992).

AGLICANO	GLICOALCALOIDE	CARBOHIDRATO
Solanidina	α -Solanina	Solatriosa
	α -Chaconina	Chacotriosa
Tomatidenol	α -Solamarina	Solatriosa
	β -Solamarina	Chacotriosa
Acetilleptidina	Leptina I	Chacotriosa
	Leptina II	Solatriosa
Tomatidina	α -Tomatina	Licotetrosa
Demissidina	Demissina	Licotetraosa
	Comersonina	Commertetrosa
Solasodina	Solasonina	Solatriosa
	Solamargina	Chacotriosa

Todos los tejidos de la planta de papa tienen el potencial de sintetizar estos compuestos. Como se mencionó anteriormente la concentración de estos compuestos varía entre especies, entre clones y por si fuera poco se han encontrado diferencias importantes entre poblaciones del mismo clón (Maga, 1980). Las concentraciones de alcaloides en los diferentes órganos de una planta determinada es variable (Gregory, 1984); sin embargo, los niveles en los diferentes órganos que se mencionan a continuación nos pueden dar una idea de los rangos presentes en las diferentes partes de las plantas (Tabla 3.2).

Cuadro. 3.2 Contenido de GAs totales en diferentes partes de la planta de papa en diferentes cultivares (mg de alcaloides/100g de peso fresco).

	Lampitt et al., 1943	Wood y Young, 1994	Kozukue et al., 1987	Friedman y Dao, 1992	Coria et al., 1998	Sarquis et al., 1999
Raiz	18-40			86		
Tallo	2.3-3.3	3	3-71	32-45		
Hojas	55-61	40-100	23-100	145		40-100
Flores	215-416	300-500	300-500			
Baya	42			38		
Brotes	195	200-400		275-1000		
cáscara	30-60	30-60				
Tubérculo	1.2-10	30-50			30-50	5-25

Toxicidad

El potencial tóxico de los alcaloides es muy alto sobre un amplio rango de organismos. Los síntomas de intoxicación por alcaloides en animales y humanos incluyen: náuseas, vómito, dolores abdominales, gastroenteritis, diarrea, fiebre, dolor de cabeza e hipertermia; mayores concentraciones pueden provocar lesiones estomacales y hemorragias internas en nariz y ojos (van Gelder, 1990). En embriones causan espina bífida, anencefalia y malformaciones faciales (Rayburn et al., 1994). La actividad reportada puede deberse a: 1) actividad anticolinestrerasa sobre el sistema nervioso central (Roddick 1989), 2) inducción de la ornitín descaboxilasa hepática (Caldwell et al., 1991), lisis de eritrocitos (Roddick et al., 1990) y destrucción de membranas celulares que afectan el sistema digestivo (Blankemeyer et al., 1992).

El efecto tóxico más estudiado de estos compuestos es el que tienen sobre las propiedades de la membrana celular. El daño por glicoalcaloides sobre el potencial de membrana se ha medido por fluorescencia con Di-4 ANEPPS (dialquilaminosteril piridinosulfonato), colorante electrocrómico con cargas positivas y negativas que se incorpora a la membrana y cambia a fluorescente en respuesta al cambio en potencial de membrana. Embriones de rana con Di-4 ANEPPS incubados con α -solanina y α -chaconina mostraron una fuerte fluorescencia. La toxicidad de los alcaloides fue diferente, la α -chaconina incrementó la fluorescencia 1600%, la solanina 400% y la solanidina no tuvo efecto. En el mismo ensayo se reportó un EC_{50} (concentración que causa el 50% de malformaciones en embriones que sobreviven) para chaconina y solanina de 2 y 8 mg/L, respectivamente. Los cambios de fluorescencia del Di-4 ANEPPS correlacionaron con la malformación y muerte de los embriones (Blankemeyer et al., 1992). Usando el ensayo FETAX se mostró que la toxicidad de otros alcaloides solanáceos varía; por ejemplo, se requirió del doble de la concentración de la solasonina, que tiene la misma cadena lateral de carbohidratos que la α -solanina, para causar el mismo efecto que la α -solanina; asimismo la tomatina fue 5 veces más embriotóxica que la α -solanina. En general, todos los aglicanos fueron mucho menos embriotóxicos que sus respectivos glicósidos. Las malformaciones inducidas por todos estos alcaloides fue muy similar (Friedman et al., 1992).

La parte glicosídica de los alcaloides ha recibido gran atención en estudios de su toxicidad. Las evaluaciones se han realizado con los triglicósidos: α -chaconina y α -solanina, sus productos de hidrólisis, los diglicósidos β_1 , β_2 -chaconina, β -solanina y los monoglicósidos γ -chaconina y γ -solanina. Los resultados han mostrado que la actividad biológica está influenciada por la estructura química del carbohidrato. El desarrollo de la toxicidad de estos compuestos en el ensayo FETAX decreció luego de la hidrólisis de los carbohidratos

de los glicoalcaloides. El orden de toxicidad de mayor a menor fue el siguiente: α -chaconina, β_1 -chaconina, α -solanina (letales en embriones) y la β_2 -chaconina, β -solanina, γ -chaconina y γ -solanina (no letales). Los embriones que mueren frecuentemente padecen anencefalia y las malformaciones más moderadas incluyeron malformaciones faciales, malformaciones viscerales y cambios en la pigmentación (Rayburn et al., 1994; Friedman et al., 1992). Ratonés alimentados con 2.4 mmoles/kg de chaconina provocaron una disminución del 10% del peso del hígado; bajo las mismas condiciones los aglicanos provocaron un aumento del 8 al 27% en dicho peso, siendo la solasodina la más ineficaz, mientras que la más potente fue la tomatidina. El incremento relativo en peso inducido por los alcaloides fue reversible. La hepatomegalia estuvo acompañada de un incremento en las actividades de 4 enzimas: fosfatasa alcalina, glutamato-oxalacetato transaminasa, glutamato-piruvato transaminasa y N-demetilasa. Exámenes histológicos mostraron colangiohepatitis, dilatación y degeneración (Friedman et al., 1996).

Actividad sinérgica de los alcaloides

Es interesante que los tejidos de las plantas de *Solanum* acumulen mayoritariamente dos diferentes GAs a partir del mismo grupo esteroidal y que uno de ellos siempre sea más tóxico: por ejemplo, α -solanina/ α -chaconina en *S. tuberosum* y *S. Vernei*, solamargina/solasonina en *S. demissium*, demissina/comersonina en *S. chacoense* y *S. demissium*, etc. (Sinden et al., 1984), pero se ha reportado un marcado sinergismo entre la α -solanina y α -chaconina en términos de mortalidad y malformaciones en el análisis FETAX (Rayburn et al., 1995) y fungitoxicidad en *R. Solani* (Fewell y Roddick, 1993).

En experimentos realizados con solamargina y solasonina, glicoalcaloides derivados de la solasodina, se observó que la solamargina consistentemente fue la más activa en la

destrucción de los liposomas (50 μM) contruidos con fosfatidilcolina/colesterol, mientras que la solasonina fue inefectiva por arriba de 150 μM . La adición simultánea de estos dos compuestos presentó un marcado sinergismo. Cuando se mezclan los alcaloides más tóxicos de diferentes fuentes, como por ejemplo solamargina con chaconina, el efecto es aditivo pero no sinérgico. Cuando se trata de dos alcaloides menos dañinos, como la solasonina y la solanina, no se observa la destrucción de la membrana. La mezcla de solamargina y solasonina destruye las membranas de protoplastos derivados de *Penicillium notatum* y eritrocitos de bovino, siendo estos últimos los más susceptibles. Cabe hacer notar que, cuando los experimentos se realizaron *in vitro* con colesterol libre, desapareció el efecto sinérgico de estos GAs (Roddick et al., 1990).

Interacción de los alcaloides con la membrana

Uno de los mecanismos por el cual los GAs causan efectos tóxicos ha sido elucidado recientemente en experimentos realizados mediante la adición de alcaloides comerciales a diversos sistemas membranales. Por ejemplo, se estudió el efecto de α -chaconina sobre membranas sintéticas (liposomas). Estos contenían en su interior peroxidasa. La liberación de esta enzima se interpretó como porcentaje de destrucción de la membrana. La α -chaconina liberó la peroxidasa atrapada en los liposomas contruidos con fosfatidilcolina, pero no tuvo efecto en liposomas libres de esteroides (Roddick y Rijnbergen, 1986). En otros casos la α -tomatina destruyó la membrana de liposomas siempre y cuando la membrana contuviera esteroides. El daño a la membrana parece correlacionar con la concentración de esteroides en los liposomas. Esta evidencia apoya la hipótesis de que la tomatina destruye la membrana por la interacción con los componentes esteroides de estas, los cuales son indispensables para su estabilidad (Roddick y Drysdale, 1984).

La solasonina y la solamargina tienen efectos similares a los alcaloides mencionados anteriormente sobre las membranas de liposomas; estos compuestos liberaron la peroxidasa de los liposomas que contenían colesterol, estigmasterol y ergosterol, mientras la solanina no causó efectos sobre liposomas con colesterol, aunque sí dañó ligeramente membranas de liposomas con estigmasterol y ergosterol. *In vitro*, la solamargina también se une eficientemente con los tres esteroides libres, mientras que la solasonina solamente se une al colesterol, aunque en menor grado que la solamargina. Por otra parte, la marcada diferencia en la respuesta de eritrocitos ricos en colesterol (lisados) a la solasonina, comparados con los protoplastos de *Penicillium* ricos en ergosterol (no lisados), indican que la susceptibilidad de las membranas podría estar influenciada por el tipo o calidad de los esteroides (Roddick et al., 1992). En resumen, la chaconina y la solamargina resultaron las más tóxicas; la solamargina se unió al colesterol tan efectivamente como al estigmasterol o al ergosterol, mientras que este no fue el caso ni de α -chaconina ni de α -solanina. La unión de la solasonina al estigmasterol y al ergosterol es mucho más reducida si se compara con la de α -solanina.

No siempre se ha encontrado correlación entre el grado de unión entre el alcaloide y el esteroide y la destrucción de los liposomas. Tal es el caso de la α -solanina, que no destruye los liposomas aún cuando forma complejos con los esteroides (Roddick y Rijnenberg, 1986).

En estudios recientes sobre la interacción de la α -solanina, α -chaconina y α -tomatina con membranas sintéticas, se demostró que las características más importantes de los GAs para que interactúen con los esteroides de la membrana son la estructura de los anillos y el grupo 3β -OH. Basados en estos datos Keukens et al. (1995) han construido un modelo para explicar la destrucción de la membrana por los GAs. Según este modelo, después de la

inserción de los GAs a la membrana, la parte aglicón se une reversiblemente a los esteroides en una relación 1:1. Cuando estos complejos aglicón-esterol en la membrana alcanzan cierta densidad se presentan interacciones de cooperatividad azúcar-azúcar entre GAs, formándose una matriz estable e irreversible de complejos GA/esterol. La presencia de glicolípidos en las membranas de colesterol resulta en un incremento en la destrucción de las membranas. La estructura y composición de los azúcares de los glicolípidos no parece ser tan importante como su concentración en la membrana. Los azúcares de los lípidos muy probablemente interaccionan por puentes de hidrógeno con los GAs, prolongando su presencia en la membrana e incrementando la oportunidad de destruirla. El sinergismo entre α -chaconina y α -solanina es un ejemplo de la interacción efectiva entre dos azúcares de GAs. Aunque la α -solanina difícilmente forma complejos con el colesterol, se logra incorporar a las membranas en una relación 1:1 en presencia de α -chaconina. La importancia de la interacción azúcar/azúcar se ilustra por el alto sinergismo entre α -solanina y α -chaconina, mientras que la actividad se pierde casi completamente después de eliminar uno o más monosacáridos de los GAs. La formación de los complejos es muy estable, como lo indica su resistencia a la extracción con detergentes. La relación GA/esterol es de 1:1 y la α -chaconina forma estructuras tubulares con una monocapa interna de fosfolípidos, mientras que la α -tomatina además de las estructuras tubulares forma estructuras esféricas (Keukens et al., 1995)

Papel de los GAs en la resistencia a hongos e insectos

El papel de los alcaloides en la resistencia de la planta de papa al ataque de hongos, bacterias, nemátodos, e insectos sigue siendo controversial. Varios investigadores han concluido que los GAs juegan un papel secundario en la defensa contra patógenos. Es claro

que los GAs son fungitóxicos, pero como la mayoría de las investigaciones enfocadas a elucidar las propiedades fungitóxicas de los GAs se han realizado *in vitro*, no necesariamente muestran su importancia *in vivo*. Por ejemplo, Allen y Kuc (1968), después de aislar la α -solanina y la α -chaconina de la epidermis de tubérculos de papa (Kennebec y Russet Burbank), adicionaron estos compuestos a cultivos de *Helminthosporium carbonum*, observando un fuerte efecto fungitóxico. La adición de GAs sobre *Phytophthora cactorum* mostró un efecto fungistático dependiente de la concentración de los GAs en el medio de cultivo. Además, la α -solanina inhibió la reproducción sexual (producción de oosporas) inducida por sitosterol, mientras el crecimiento hifal fue relativamente inafectado (Nes et al., 1982). Pruebas de la actividad antifúngica de la α -chaconina y α -solanina contra *Ascobolus crenulatus* (saprófito), *Alternaria brassicola*, *Phoma medicaginis* (no patógenos) y *Rhizoctonia solani* (patógeno) mostraron que los GAs resultaron ser letales (LD_{50} 50 μ M) para todos estos hongos, excepto para *R. Solani*, el cual mostró una reducida sensibilidad a los GAs empleados (Fewell and Roddick, 1993). Sin embargo, la presencia de los GAs debe jugar algún papel de defensa, ya que algunos hongos son capaces de degradar los GAs a formas menos tóxicas. Dos especies de hongos patógenos de la papa, *Giberella pulicaris* y *Fusarium sambucinum* (R-6380 y R-7843), agente causal de la pudrición seca (tiene pocos esteroides en la membrana) fueron capaces de metabolizar α -chaconina y α -solanina, vía eliminación α -1,2-ramnosa liberando β -2-chaconina y finalmente a solanidina. La cepa R-7843 no fue capaz de metabolizar la solanina, mientras que la R-6380 la hidrolizó hasta γ -solanina (Weltring et al., 1997). Experimentos *in situ* mostraron que la acumulación de GAs esteroideos inducida por daños mecánicos en tubérculos es inhibida por la presencia de *P. infestans*. Este hongo inhibe la síntesis de GAs e induce la síntesis de la fitoalexina reshitina (Shih y Kuc, 1973).

Poblaciones de *S. tuberosum* repetidamente seleccionadas para resistencia a la cigarrita de la papa (*Empoasca fabae*) fueron evaluadas para niveles foliares de glicósidos de solanidina. Después de siete generaciones de selección el nivel de infestación de la cigarrita fue 57% más bajo que en la población original. Las concentraciones medias de glicósidos incrementaron de 40 a 65 mg /100g de peso fresco. Estudios *in vitro* mostraron que 80 mg/100g de tejo fresco retrasan el desarrollo de la ninfa de *E. fabae*, aunque no afectan su sobrevivencia (Sanford et al., 1990). Diversas especies silvestres de papa y jitomate con alta concentración de alcaloides en hoja mostraron una correlación pobre entre la concentración de alcaloides y resistencia a patógenos. En *S. Chacoense*, que sintetiza al menos 10 diferentes GAs en altas concentraciones, tampoco se encontró una correlación importante con la resistencia al escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Sinden et al., 1991). Experimentos con 4 cultivares de papa mostraron una diferencia significativa en susceptibilidad al ataque de gusano de alambre (*Agriotes obscurus*). Los dos cultivares más susceptibles mostraron menor contenido de GAs totales. Tejidos con altas concentraciones de GAs totales no fueron consumidos por el gusano de alambre (Jonasson y Olson, 1994).

Finalmente, los GAs de la papa también fueron identificados como factores de resistencia al escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) y a la cigarrita verde (*Empoasca fabae*) por Tingey (1984).

Efecto de temperaturas supraóptimas sobre el desarrollo de la papa.

Nuestro laboratorio ha documentado las siguientes alteraciones fisiológicas en plantas de papa sujetas a estrés por calor: disminución de la velocidad del crecimiento, del área foliar, de la concentración de almidón y del tamaño del tubérculo; el tallo se alarga más de

lo normal, se adelanta la floración y se incrementa la respiración (Sarquís et al., 1996). El tubérculo se amarga, efecto que Sinden y Webb (1972) han asociado a la acumulación excesiva de GAs en dicho órgano.

Acumulación de glicoalcaloides inducida por calor.

Son escasos los antecedentes respecto al efecto de la temperatura elevada sobre la acumulación de GAs y los pocos estudios reportados en la literatura se han realizado a temperaturas un poco arriba del óptimo (21°C). Por ejemplo, Linnemann et al., (1985) reportaron una disminución en el contenido total de GAs en tubérculos del clón Bintje conforme se incrementó la temperatura (7, 16 y 28°C) durante 12 semanas. Edwards y Cobb (1997) no encontraron cambios en la concentración de GAs en tubérculos del clón King Edward incubados a 5, 10, 20 y 25°C durante 8 días. Por otra parte Currier y Kuc (1975) reportaron acumulación de GAs totales en tubérculos del clón Kennebec incubados a 25 y 30°C. Asimismo, tubérculos del clón Russet Burbank incubados a 25°C presentaron niveles de GAs totales más altos respecto a los encontrados en tubérculos incubados a 5°C; la proporción de α -chaconina/ α -solanina también se incrementó (Maga, 1981). A mayores temperaturas (35°C), el tejido de tubérculo no modifica la concentración de alcaloides totales, pero sí cambia la proporción de α -solanina/ α -chaconina, lo cual podría incrementar el potencial tóxico de estos compuestos (Coria et al., 1998). La glucosilación de los alcaloides, paso final de la biosíntesis de los alcaloides, parece no ser limitante bajo condiciones de estrés, ya que se ha reportado un incremento en la actividad de la UDP-glucosa solanidin-glicosil transferasa (SGT, EC 2.4.1) con el aumento en la temperatura.

Metabolismo de carbohidratos bajo estrés por calor.

El estrés térmico afecta notablemente el metabolismo de carbohidratos. Los cambios más importantes son el decremento en la concentración de almidón en el amiloplasto y la

acumulación de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) en el citoplasma de las células del endospermo del tubérculo (Sowokinos, 1990). Se han investigado diversas enzimas de la ruta metabólica del almidón, sacarosa y glicólisis, pero se desconoce el mecanismo del efecto del calor sobre la regulación de estas rutas. Para poder interpretar el efecto del estrés por calor sobre la conversión almidón/azúcar, es necesario entender primero los mecanismos que regulan la partición del carbono dentro del tubérculo. El sistema teórico de la partición del carbono en tubérculos de papas se presenta en la fig. 3.2; aunque es un esquema simple sirve como modelo para definir las reacciones relevantes en la presente investigación.

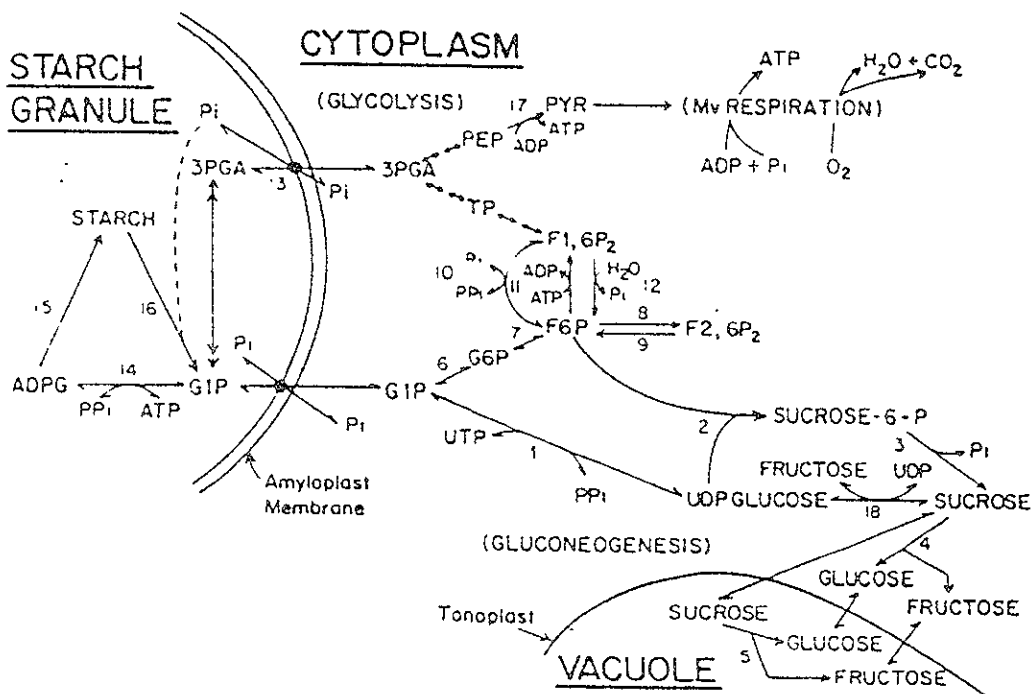


Fig. 3.2 Esquema teórico para la partición del carbono en tubérculos de papa. Las enzimas representadas son: 1) UDPglucosa pirofosforilasa, 2) sacarosa 6-P sintetasa, 3) sacarosa 6-P fosfatasa, 4) invertasa alcalina, 5) invertasa ácida, 6) fosfoglucomutasa, 7) fosfohexosa isomerasa, 8) fru 6-P-cinasa. 9) fru 2,6-bisfosfatasa, 10) PPi-fosfofructocinasa, 11) ATP-fosfofructocinasa, 12) fru 1,6-bisfosfatasa, 13) transportador de triosa fosfato/Pi, 14) ADP-glucosa pirofosforilasa, 15) almidón sintetasa, 16) almidón fosforilasa, 17) piruvato cinasa y 18) sacarosa sintetasa. Tomado de Sowokinos (1990).

La temperatura óptima a la cual el ^{14}C (sacarosa) se incorpora al almidón en tubérculos en desarrollo es de 21.5°C. Cuando se incrementa la temperatura a 31°C el ^{14}C se incorpora preferencialmente al CO_2 respiratorio y a los azúcares solubles (Krauss y Marschner, 1984; Mohabir y John, 1988) mientras que los niveles de almidón disminuyen, lo cual correlaciona con la inhibición de la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPP, EC 2.7.7.27) (Lafta y Lorenzen, 1995).

Los mecanismos que regulan la acumulación de azúcares en el citoplasma sigue siendo tema de discusión; por ejemplo, Richardson et al. (1990) reportaron que la actividad de la sacarosa sintetasa (SS, EC 2.4.1.13) disminuye en 72% en tubérculos incubados a 31°C. Típicamente, la actividad de la SS disminuye después de la cosecha de los tubérculos y permanece baja aún a temperaturas infraóptimas (4°C), las cuales son inductoras de esta actividad. Por otra parte Xu et al., (1989) reporta que el proceso sucrolítico activado durante el estrés por calor es proporcional a la activación de la SS en *S. tuberosum*. Además, se ha demostrado que SS es estable a altas temperaturas, incluso en tomate (*Lycopersicon chmielewskii*), la actividad mostró una temperatura óptima a 50°C (Sun et al., 1992).

En forma concomitante al incremento en la actividad de la SS, la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa (SPS, EC 2.4.1.14) en tubérculos suele verse reducida ligeramente a altas temperaturas aunque los niveles de azúcares en tubérculos de papa no se afecten por la temperatura (Lafta y Lorenzen, 1995).

Algunos investigadores han considerado la degradación de la sacarosa como un posible punto de control en la acumulación de hexosas. La hidrólisis de la sacarosa a triosa-P fue activada por fructosa 2,6-P₂. La vía de la SS tiene su principal papel en tejidos de almacenamiento (Xu et al., 1989).

La concentración de fósforo inorgánico (Pi) parece jugar un papel importante en el endulzamiento de los tubérculos de papa. Alta concentración de Pi coincide con un incremento en la concentración de azúcares en el citoplasma de las células y con la reducción en la concentración de almidón en los amiloplastos. La inhibición de la síntesis de almidón se da en dos sitios principalmente: a nivel de la AGPP cuyo producto, ADP-glucosa, es el donador glucosilo primario para la síntesis de almidón (Sowoquinos, 1981; Mohabir y John, 1988) y a nivel de la activación de la degradación (fosforólisis) del almidón por medio de la α -glucano fosforilasa (Sowoquinos et al., 1985). El secuestro de Pi citoplásmico por manosa incrementa la síntesis de almidón (Sowoquinos, 1990).

Altos niveles de Pi (5 mM) en el citoplasma parecen reducir los niveles de fru-2,6-P₂ la cual estimula la glicólisis. El Pi reduce la afinidad de la PPI-PFK por la Fru-2,6-P₂ (Sowokinos, 1990).

Los amiloplastos libres de células no mostraron disminución en el porcentaje de síntesis de almidón cuando la temperatura se cambió de 21 a 31°C, sugiriendo que el transporte de triosas al amiloplasto y los subsiguientes pasos de la biosíntesis del almidón no son responsables de la inhibición de la síntesis de este (Mohabir and John, 1988).

La SPS de hojas de espinaca es fuertemente inhibida por Pi. El Pi antagoniza con la activación de Glucosa-6-P (incrementa la concentración de Glu-6-P necesaria para alcanzar el 50% de la actividad máxima). El Pi puede interactuar con la SPS en 3 sitios distintos, dependiendo de la concentración de los sustratos: en el sitio de unión de la UDP-G, o de la F6P, o en el sitio de activación de la G6P (Doehlert y Huber, 1983). Existe evidencia de que la inhibición del Pi sobre la SPS no es universal y de que su actividad varía dependiendo de la especie. Crafts-Brandner y Salvucci (1989) reportaron que la inhibición de la SPS por Pi fue mayor en espinacas que en tabaco, trigo o maíz.

El hecho de que la acumulación de azúcares solubles y la síntesis de GAs se induzcan con los mismos factores ambientales sugiere que la acumulación de GAs podría cambiar la permeabilidad de las membranas celulares alterando la partición del carbono por cambios en la compartimentalización celular del Pi.

IV. HIPÓTESIS

La acumulación de solanidina, α -solanina y α -chaconina en tubérculos de papa bajo condiciones de estrés por calor altera la permeabilidad de las membranas de las células del endospermo, provocando alteraciones en la compartimentalización de Pi, lo cual podría propiciar la degradación de almidón con la concomitante acumulación de azúcares en el citoplasma celular.

V. OBJETIVOS

Determinar el efecto de la acumulación de la α -solanina, α -chaconina y solanidina en el tubérculo de papa bajo condiciones de estrés calórico sobre:

- a) Permeabilidad de la membrana celular
- b) Actividad deshidrogenasa
- c) Concentración de Pi
- d) Concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón

VI. METAS ESPECÍFICAS

- 1.-Validar una metodología para la extracción, purificación y cuantificación de α -solanina, α -chaconina y solanidina.
- 2.- Seleccionar una progenie susceptible y otra tolerante a calor.
- 3.-Analizar el efecto de los alcaloides aplicados exógenamente sobre el goteo iónico y reducción del TTC por el tejido de tubérculo.
- 4.-Determinar los patrones de acumulación en tubérculo de papa bajo estrés por calor de los siguientes metabolitos:
 - a) Glucosa
 - b) Sacarosa
 - c) Fructosa
 - d) Almidón
 - e) Fósforo inorgánico

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los estándares comerciales de los alcaloides α -solanina, α -chaconina, solanidina, sorbitol, Mes-NaOH, Tris-HCl, celulasa, pectoliasa, sorbitol y EDTA fueron obtenidos de Sigma, Chemical Company (St. Louis, Mo. USA). El resto de los reactivos empleados fueron adquiridos localmente. Estos incluyeron: cloroformo, hidróxido de amonio, metanol absoluto, etanol absoluto, fenol, ácido sulfúrico, hidróxido de amonio, hipoclorito de sodio, n-octanol, dicromato de potasio, azul de bromofenol, sulfato sérico amoniaco, TTC (2,3,5-triclorofenil cloruro de tetrazolio), fosfato de potasio monobásico y dibásico, yoduro de potasio, molibdato de amonio, sulfato ferroso, TCA (ácido tricloroacético), DMO (dimetil sulfóxido), cianoferruro de potasio, sulfato de zinc, cloruro de calcio y cromatoplasmas (silica gel 60, 20 x 20 cm, espesor 0.25 mm, Merck. Fisher)

Material biológico

Se usaron tubérculos de 10 clones y una progenie híbrida proveniente de semilla verdadera de papa (TPS); los clones incluyeron DTO-33, LT-5, LT-7, LT-8, LT-9, MF-II, TPS-7, TS-5, TS-9 TS-10 y TS9 X TPS113. Estos materiales fueron donados por el Centro Internacional de la Papa (CIP-Perú). Además, se utilizó el clón Atlantic como control susceptible al estrés térmico. Los clones donados por el programa de Fisiología Vegetal del CIP representan una colección de germoplasma seleccionado por resistencia a calor en condiciones de trópico bajo, así como para resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*). Todos ellos son materiales previamente seleccionados por características

agronómicas y productividad que han sido utilizados como parentales hembras o machos aptos en la producción de semilla sexual de papa.

Condiciones de cultivo

Ciclo otoño/invierno 1996/1997

Este primer ciclo se realizó en las instalaciones del Instituto de Capacitación Agrícola, Forestal y Pecuaria del Estado de México (ICAMEX) en el campo experimental El Islote, en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México.

La semilla sexual se sembró en charolas de germinación (20 x 30 x 18cm) en medio peatmoss mezclado con agrolita (1:1). Las charolas se mantuvieron en invernadero durante un mes hasta que las plántulas alcanzaron una talla de 20cm aproximadamente. Durante este tiempo se regó diariamente con solución fertilizante Peters (11-45-15 a razón de 4.5 g/L). El transplante se llevó a cabo el 12 de octubre, en una cama de 1 x 50m en suelo arenoso dentro del mismo invernadero. La cama fue previamente fertilizada mezclando 40g de sulfato de amonio, 80g de superfosfato de calcio triple y 60g de cloruro de potasio por m². Durante el cultivo se practicó control preventivo de plagas y enfermedades a base de aplicaciones semanales de mezclas de insecticidas como Talstar, Diazinón y Lannate con fungicidas como Flonex, Ridomil y Captam. Comúnmente se usaron dos insecticidas y dos fungicidas en cada aplicación, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cortó el follaje a los 90 días después del transplante y finalmente la cosecha de los tubérculos se realizó a los 105 días después del transplante.

Ciclo Verano/1997

Este segundo ciclo se realizó en condiciones de campo en un predio particular de la localidad de Villa Victoria, Estado de México. Los tubérculos cosechados del ciclo anterior

se mantuvieron a 4°C de octubre a finales de abril, entonces se sacaron de la bodega y se colocaron bajo luz difusa a temperatura ambiente para promover el brotamiento. Este se presentó después de 4 semanas en las condiciones indicadas y así el material estuvo listo para la siembra del 6 de junio. Previamente el terreno (suelo franco arenoso, profundo) se preparó mediante barbecho y 2 pasos cruzados de rastra, seguidos de la aplicación de la primera fracción de la dosis total de fertilizante (200-230-230), que incluyó todo el fósforo, 50% del nitrógeno y 50% del potasio. La fertilización se hizo a base de sulfato de amonio, superfosfato de calcio triple y sulfato de potasio. Enseguida se hicieron los surcos a 1m uno de otro, se tiró la semilla a 25cm una de otra y se tapó. Finalmente, se aplicó 1.5 Kg/ha de herbicida Sencor. La segunda fracción de fertilizante, incluyendo 25% de nitrógeno y 25% de potasio, se aplicó a los 30 días después del transplante y la última, con lo restante, 20 días después. El control preventivo de plagas y enfermedades se llevó a cabo como en el ciclo anterior, excepto que las aplicaciones fueron un poco más frecuentes, hasta 2 veces por semana durante la parte del ciclo más abundante en lluvia, que fue durante el mes de julio. Se secó el follaje aplicando el herbicida Gramoxone (2 kg/ha) y 15 días después se cosecharon los tubérculos, el 18 de octubre. En ambos ciclos, los tubérculos destinados a la experimentación que se describe a continuación fueron almacenados a 10°C, en oscuridad y con 85% de humedad relativa.

Toma de muestras.

Una semana después del almacenamiento de los tubérculos se empezaron a tomar las muestras semanalmente. En cada ocasión, cada muestra consistió de 3 tubérculos, cada uno de ellos de aproximadamente 60g. Las papas fueron lavadas y desinfectadas por inmersión en NaClO al 1.5% durante 3min, luego se les enjuagó con agua corriente hasta la

desaparición del olor del hipoclorito y se les secó con papel toalla. Los tubérculos completos (incluyendo la cáscara) se cortaron en cubos pequeños de aproximadamente 5 mm y se mezclaron hasta obtener una mezcla homogénea de los tres tubérculos. Enseguida se tomaron submuestras de 0.5g a excepción de que se indique otro peso; cada ensayo consistió por lo menos de 3 repeticiones.

Experimentos con estrés por calor.

El tejido del tubérculo (0.5g) se colocó en matraces con 30ml de agua desionizada para someter el tejido a estrés térmico durante 4h mediante la incubación a 22, 30, 35, 40 o 50°C en baño con agitación (Yamato, Constant temperature shaking bath, model BT-31).

El daño por calor se evaluó mediante dos diferentes técnicas. Por conductimetría (Uemura y Yoshida, 1984) se estimó el daño a nivel de membrana celular midiendo el goteo iónico (EC/pH CONSORT C731) a intervalos de 30min durante las 4h del tratamiento. El daño a membrana se expresó como:

$$\% \text{ de goteo iónico} = (EC1-EC0) / (EC2-EC0) \times 100$$

Donde, EC0 es la conductividad eléctrica del agua desionizada a pocos segundos de agregar el tejido, EC1 es la conductividad eléctrica de la muestra a cada intervalo de medición y EC2 es la conductividad eléctrica después de que la muestra ha sido congelada y descongelada.

El segundo método utilizado para evaluar el daño por calor fue a nivel de la respiración (i.e., actividad deshidrogenasa) mediante la prueba del TTC (2,3,5-Triclorofenil cloruro de tetrazolio) reportada por Hwei-Hwang et al. (1982). En este caso, submuestras de tejido de tubérculo de 0.5g cada una se colocaron en un matrás con 3ml de agua desionizada y se incubaron durante 4h a diferentes temperaturas. Luego del tratamiento específico, se lavó

el tejido dos veces con agua bidestilada y se agregaron 3ml de solución de TTC al 0.08% en amortiguador de fosfatos 0.5M (pH 7.4); se infiltró al vacío durante 10min (Buchi CH-9230) y se incubó en oscuridad durante 18h. Transcurrido este tiempo se descartó la solución de TTC, se enjuagó el tejido dos veces con agua bidestilada, se adicionaron 3ml de etanol al 95% y se incubó a 100°C hasta la evaporación total del etanol. Finalmente, se adicionó al tejido 3ml de etanol al 95%, se agitó la mezcla vigorosamente y se leyó la absorbancia (Spectronic Genesys 5, Mylton Roy) del TTC reducido a 485 nm.

Tratamiento del tejido con calcio y alcaloides

Las muestras del tejido de tubérculo se prepararon como se describió anteriormente. La adición de calcio 5 mM o 50 μ M de una mezcla de alcaloides en concentraciones equimolares de α -solanina, α -chaconina y solanidina se realizó de dos formas. La primera consistió en preincubar el tejido en CaCl_2 o en alcaloides durante 2h. Posteriormente, se descartó la solución, se enjuagó el tejido y se incubó a temperaturas supraóptimas en 30ml de agua desionizada para evaluar el porcentaje de goteo iónico o, alternativamente, se incubó el tejido en un volumen de 3ml para la prueba del TTC. La otra forma de medir el efecto de la adición de calcio y alcaloides fue someter el tejido al estrés térmico en presencia de estos compuestos. La concentración de calcio y alcaloides fue seleccionada de curvas de dosis-respuesta que indicaron un decremento de 40 a 50% en la actividad reductora de TTC con 50 μ M de alcaloides en Atlantic y la completa recuperación del tejido estresado para reducir TTC con 5 mM de CaCl_2 en el mismo clón.

Montaje de la técnica para la cuantificación de alcaloides

La caracterización del contenido de glicoalcaloides (GAs) es un tema recurrente y

polémico. Las principales causas de desacuerdo en la literatura han sido probablemente los problemas asociados con la metodología. Los métodos para el análisis de GAs consta de tres partes. Coxon (1984), en su revisión de metodología los llama: extracción, purificación y cuantificación. El primer paso involucra extracción de todos los compuestos de interés, el segundo es la separación de los compuestos de interés y el último determina la concentración de los alcaloides de interés.

Extracción

La literatura describe alrededor de 20 solventes diferentes usados en la extracción de GAs, lo cual nos da una idea de lo difícil de la extracción sin pérdidas importantes de estos compuestos. En el presente trabajo se evaluaron 4 técnicas diferentes: 1) ac. acético acuoso al 5%; 2) Metanol; 3) Incubación del tejido a 50°C durante 30min en metanol antes de la homogeneización del tejido; 4) Cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (45: 50: 5). La mayor recuperación relativa de extracción de los 3 alcaloides de interés se obtuvo homogeneizando 5g de tejido en 50ml de metanol.

Purificación

Los GAs fueron precipitados con hidróxido de amonio concentrado (Kuc, 1975; Fitzpatrick et al., 1978; Friedman y Dao, 1992). La literatura no precisa el pH exacto al que los alcaloides precipitan, los reportes se limitan a mencionar un pH mayor a 10. Por ello en el presente trabajo se hicieron pruebas a diferentes pH (9.5, 10, 10.5, 11, 11.5 y 12). Después de ajustar el pH se incubó la muestra a 70°C durante 30min, se incubó a 4°C durante toda la noche y se centrifugó 12,500 rpm durante 1h. El precipitado se resuspendió en metanol absoluto y una alícuota de esta mezcla se usó para separar los alcaloides por cromatografía en capa fina. Se probaron varios sistemas de solventes en diferentes proporciones, en forma ascendente y en forma descendente también: cloroformo:metanol,

cloroformo:metanol:hidróxido de amonio y etilo acetato:piridina:agua. La detección de los alcaloides en las cromatoplasmas se realizó con vapores de I_2 para la cuantificación por azul de bromofenol o con sulfato sérico amoniacal para cuantificar por densitometría.

Cuantificación

Los alcaloides se cuantificaron inicialmente por colorimetría usando la técnica de Mackenzie y Gregory (1979), la cual usa 5ml de azul de bromofenol al 0.067%, fenol al 10% en metanol absoluto para titular todos los nitrógenos básicos, la concentración se determina leyendo la absorbancia de las muestras a 600 nm. Para cuantificar los alcaloides por densitometría, se revelaron las placas con sulfato sérico amoniacal.

A continuación se describe la técnica finalmente usada en el análisis de rutina para la determinación cuantitativa de alcaloides en tejido de tubérculos de papa.

Análisis cuantitativo de alcaloides en tubérculos de papa

Para la extracción de los alcaloides se usó la técnica reportada por Bushway et al. (1985) y Fitzpatrick et al., (1978). Muestras de 10g de tejido se homogeneizaron (Polytrón Ultraturrex) en 50ml de metanol absoluto. El extracto metanólico se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min; los alcaloides disueltos en el sobrenadante se concentraron a presión reducida (Rotavapor-R Büchi, CH-9230) hasta reducir el volumen a 15ml. Se ajustó el pH a 11.5 con hidróxido de amonio al 30%, se incubó a 70°C durante 30 min y se mantuvo en reposo durante toda la noche a 4°C. Enseguida se centrifugó la muestra a 12,000 rpm durante 1h y se resuspendió luego el precipitado en 1ml de metanol absoluto.

La separación de α -solanina, α -chaconina y solanidina se realizó por cromatografía de filtración sobre gel en capa fina (sílica gel 60, Merk) en placas previamente activadas a 100°C durante 1h. A diferencia de la cromatografía en capa fina convencional, en donde el

flujo es producido principalmente por fuerzas de capilaridad, en la técnica empleada aquí el flujo usa la fuerza de gravedad; el líquido es transportado por un puente de papel filtro en ambos extremos y la placa se mantiene con una inclinación de aproximadamente 45° (Fisher, 1980). Las muestras se corrieron en un sistema de solventes cloroformo: metanol: hidróxido de amonio 3% (50:50:3 v/v) a 10°C durante 6h (técnica modificada de Curier y Kuc, 1975). Esta técnica permitió una excelente resolución de los tres alcaloides de papa. Las placas con los alcaloides separados se revelaron con una mezcla de sulfato sérico amoniacal (12g), 350g de hielo y 5.55ml de ácido sulfúrico y se incubaron a 100°C durante 5 min. Las bandas de interés se identificaron mediante estándares comerciales en cada cromatopla. Los alcaloides purificados se cuantificaron por densitometría (Multimage light cabinet, Alpha Innotech Corp.) interpolando los valores de densidad integrada a las curvas patrón de cada alcaloide por separado.

Cuantificación de fósforo inorgánico (Pi)

Para estos ensayos se utilizó la técnica del molibdato según Tanski et al. (1985). En cada ocasión, muestras de 5g de tejido fresco de tubérculo fueron homogeneizadas (Polytron Ultraturax) en 10ml de agua bidestilada y filtradas a través de gasa doble; posteriormente se lavó el residuo tres veces con agua bidestilada para luego agregar el agua de los lavados al filtrado original y finalmente se aforó a 35ml. Enseguida se centrifugó el extracto a 10,000 rpm (Jouan, MR22) durante 15min para su clarificación. Se adicionó TCA a una concentración final de 10%, la mezcla se agitó lentamente durante 15min y se centrifugó a 15,800 rpm durante 15min para lograr la remoción de proteínas. Posteriormente, 1ml de sobrenadante se mezcló con 1ml de TCA 0.5 N y 1ml de colorante (2g de sulfato ferroso disueltos en 4ml de molibdato de amonio al 16% en ácido sulfúrico 10N aforando luego a

26ml con agua desionizada) y se incubó a temperatura ambiente durante 20min para el desarrollo del color azul. Finalmente se leyó la absorbancia a 660 nm. En cada ensayo se usaron simultáneamente 120 nmoles de estandar $\text{Pi}(\text{K}_2\text{HPO}_4)$ para verificar la determinación. La cuantificación de Pi en el extracto acuoso se determinó interpolando la absorbancia de la muestra con una curva patrón cuya concentración varió de 0 a 300 nmoles de Pi.

Cuantificación de azúcares y almidón

Los azúcares reductores así como el almidón presente en las muestras de tejido de tubérculo se determinaron usando kits de Boehringer (Cat. No. 716260 y 207748, respectivamente). Con esta técnica la cuantificación individual de los azúcares libres en un extracto crudo se realiza espectrofotométricamente a partir de la absorbancia del NADPH liberado por la oxidación acoplada de los diferentes azúcares. Cada muestra consistió de 5g de tejido fresco que se homogeneizaron en 20ml de agua bidestilada. Se adicionaron 0.250ml de de solución de Carrez I (3.6g de cianoferruro de potasio se aforan con 100ml de agua bidestilada), 0.250ml de Carrez II (7.2g de sulfato de zinc se disuelven en 100ml de agua bidestilada) y 0.030ml de n-octanol; luego se ajustó el pH a 7.3 y se aforó a 25ml con agua destilada. Se centrifugó a 7,500 rpm (Jouan, MR22) durante 10min y el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de glucosa, sacarosa y fructosa, mientras que la pastilla se usó para determinar la concentración de almidón. A cada muestra de sobrenadante se adicionó la enzima hexocinasa (HK) en presencia de ATP a pH 7.6 para fosforilar la D-glucosa libre. Luego la glucosa 6-P formada se oxidó a gluconato 6-P con la formación concomitante de NADPH y entonces se tomó la primera lectura (A1) de absorbancia a 340 nm (Spectronic Genesys 5, Milton Roy). Con la adición de la

invertasa (β -fructosidasa) a pH 4.6 se hidrolizó la sacarosa para liberar D-glucosa y fructosa; entonces se tomó la segunda lectura (A2). El contenido de sacarosa se calculó por diferencia entre A2 y A1. Posteriormente se adicionó al extracto la fosfofructosa isomerasa para convertir la fructosa en glucosa y repetir la reacción de oxidación de la glucosa, luego de lo cual se tomó la tercera lectura (A3), que se usó para calcular la concentración de fructosa total por la diferencia entre A3 y A2.

Por último, para la determinación de almidón en la pastilla se solubilizó éste con DMSO y posteriormente se hidrolizó adicionando la amiloglucosidasa (AGS) en amortiguador de citrato a pH 4.6. La D-glucosa liberada se fosforiló en presencia de ATP y luego se oxidó con la formación simultánea de NADPH como se describió antes.

Obtención de amiloplastos a partir de protoplastos

Para la obtención de amiloplastos se siguió la técnica descrita por Mohabir y John (1988) con algunas modificaciones. Tubérculos de papa recién cosechados se lavaron con detergente y agua, posteriormente se sumergieron en 10% de ácido clorhídrico durante 10min. Bajo condiciones estériles, los tubérculos se enjuagaron muy bien con agua estéril y el tejido de 3 tubérculos se cortó en cubos de 7 mm aproximadamente, se mezcló el tejido de los tres tubérculos y se tomaron muestras de 5g. El tejido se plasmolizó en un matraz Erlenmeyer de 100ml con 50ml de sorbitol 0.6M, con agitación, constante a temperatura ambiente durante 1h. Transcurrido el tiempo de incubación se desechó la solución de sorbitol y el tejido se enjuagó con agua estéril. Con la finalidad de degradar la pared celular y liberar protoplastos, el tejido se resuspendió en 25ml de medio de digestión (Tabla 7.1) y se incubó con agitación constante durante 24h a 8°C en oscuridad. El tejido digerido se filtró a través de nylon (Merck, 50 mesh) para eliminar el tejido no digerido y

el filtrado se resuspendió en el medio de lavado (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.1 Medio de digestión para la obtención de protoplastos

Reactivos	Concentración
Sorbitol	0.5 M
Cloruro de calcio	10 mM
Cloruro de potasio	10 mM
Mes-NaOH (pH 5.5)	25 mM
Penicilina (100u)	112 µl/25ml
Estreptomycin (50 µg/ml)	200 µl/25ml
Celulasa (Onozuca R-10)	1 mg/25ml
Pectoliasa	15 µg/25ml

Cuadro 7.2 Medio de lavado de protoplastos

Reactivos	Concentración
Sorbitol	0.45 M
Cloruro de calcio	10 mM
Cloruro de potasio	10 mM
EDTA	2 mM
Tris-HCl (pH8.0)	50 mM

Las células libres fueron separadas de los amiloplastos por sedimentación diferencial; en otras palabras, la mayor parte de los amiloplastos son recuperados manteniendo en reposo el tejido digerido durante 2h gracias a que éstos se depositan en el fondo formando una pastilla compacta. En este paso se obtienen protoplastos contaminados con 10% de

amiloplastos aproximadamente; sin embargo, se eliminan fácilmente si los protoplastos se colocan en un tubo de ensayo con suficiente medio de lavado, se agita ligeramente y después de unos segundos de reposo se toman cuidadosamente unos cuantos mililitros de la superficie con una pipeta pasteur. Se repite este paso varias veces hasta recuperar el mayor número de protoplastos. En forma independiente los protoplastos y amiloplastos aislados fueron resuspendidos en un volumen mínimo de medio de resuspensión (nicodenz 20%, 1 mg/ml de SBA y DTT 5mM). Los resultados obtenidos por esta técnica se muestran en las figuras 7.1 y 7.2



Fig. 7.1 Protoplastos de tubérculos de papa (40x)

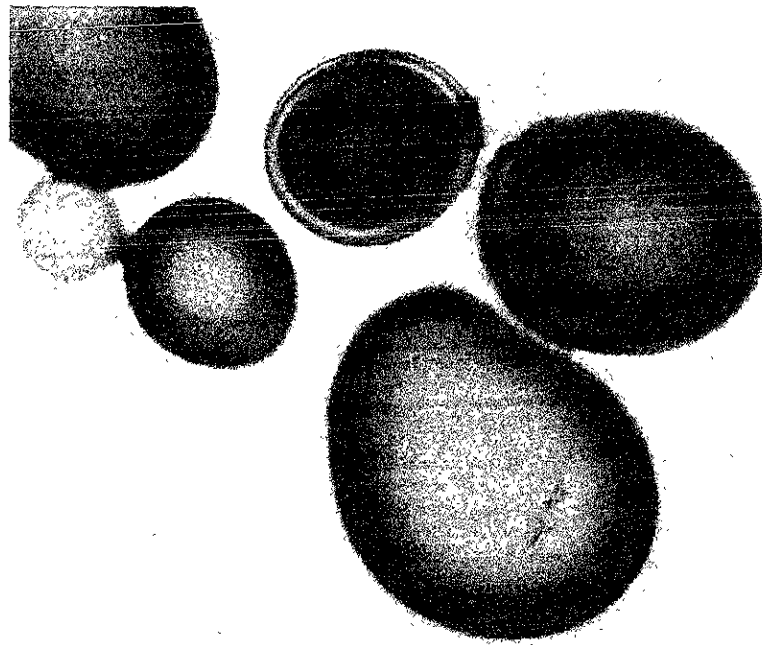


Fig. 7.2 Amiloplastos teñidos con yoduro de potasio, obtenidos a partir de protoplastos (100x)

Western blot (SGT)

0.5g de tejido de tubérculo se congeló en nitrógeno líquido y se homogeneizó en 1ml de amortiguador de extracción el cual se preparó con Tris-HCl 65mM a pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, EDTA 2mM, PMSF 1mM (Woodson, 1987). Se eliminó la SBA del amortiguador porque dió reacción cruzada con el anticuerpo de SGT y se adicionaron los inhibidores de proteasas: DTT, pepstatina y leupeptina. El homogeneizado se centrifugó a 12,000 rpm durante 15min y el sobrenadante se incubó a 90°C durante 5min. La concentración de proteínas en el extracto crudo se determinó usando el kit Coomassie dye binding assay de Bio-Rad, catálogo 500-0006 y las D.O. se derterminaron a 595 nm.

La separación de péptidos se realizó por el método electroforético reportado por Laemmli (1970); se usó un gel apilador al 5% y un gel separador en gradiente de 10 a 20%. Los estándares de PM se obtuvieron de Sigma. La electroforesis se corrió durante 3.5h a 25 mA. Los péptidos separados por electroforesis fueron transferidos a papel de nitrocelulosa Whatman (No. de catálogo 3030-866). La transferencia se realizó a 15V durante la noche. Transcurrido este tiempo, la nitrocelulosa se incubó en amortiguador bajo en sales (LSB, cloruro de sodio 0.9 % y Tris-HCl 10mM a pH 7.5) más leche descremada al 5% (LSBM) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante; se descartó el amortiguador y se lavó con LSB. Posteriormente, se adicionó el primer anticuerpo (Ab-SGT, 1:2000, donado por el Dr. Belknap, Departamento de Agricultura, Albany CA, USA), en LSBM en un volumen final de 25 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 2h con agitación constante. Se lavó y se adicionó el 2º anticuerpo (Ab α -Rabbit conjugada a peroxidasa, Amersham, Arlington Heights, IL) en una dilución 1:2500 en un volumen final de 25ml en LSB durante 1h a temperatura ambiente con agitación constante. Transcurrido este tiempo se eliminó el amortiguador, se lavó y los péptidos se visualizaron por quimioluminiscencia con el sistema de detección ECL (Amersham).

Northern blot

A 100mg de tejido se adicionó nitrógeno líquido para homogeneizarlo. Con una espátula se tomó el tejido pulverizado y se depositó en un microtubo e-ppendorf. Inmediatamente después, se adicionó 1ml de Tri-reagent (Gibco, cat. No. 15596-026) que incluye fenol y tiocinato de guanidina, una solución mono-fase líquida. Se agitó vigorosamente y se incubó durante 5min a temperatura ambiente con agitación lenta. Con la finalidad de separar el RNA se adicionaron 0.2ml de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15s y

se incubó durante 5min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10min a 4°C.

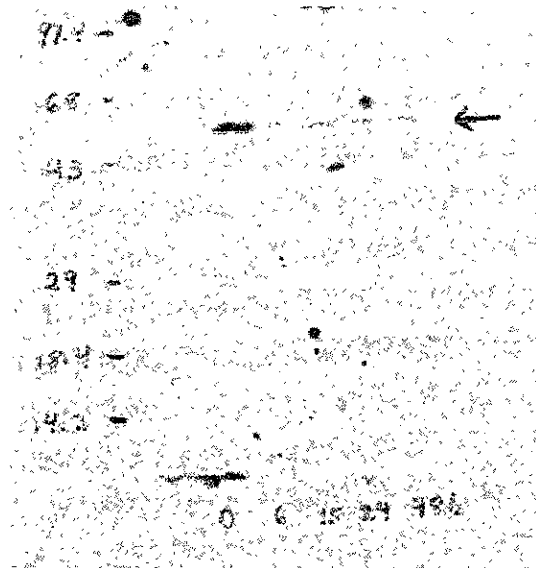


Fig. 7.3 Western blot de la Solanidin-glucosil transferasa en papel de nitrocelulosa. Las bandas se revelaron por el sistema ECL de Amersham

El hodgeizado se separó en 3 fases: acuosa, interfase y orgánica. El RNA permanece en la fase acuosa, el ADN en la interfase y las proteínas precipitan en la fase orgánica. Con una pipeta se recuperó la fase acuosa (superior) y el RNA se precipitó adicionando 0.5ml de isopropanol, se incubó durante 10min a temperatura ambiente con agitación lenta y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta y el precipitado se lavó con 1ml de EtOH al 80%. Se agitó vigorosamente (vortex) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante

y el precipitado se disolvió en 0.1ml de SDS al 0.5% y se incubó a 60°C durante 15min. La concentración de RNA se determinó leyendo las D.O. a 260 nm (Chomcsynski y Sacch, 1987). Los RNAs se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, los cuales se prepararon de la siguiente manera: a 40ml de amortiguador TBE (54g Tris, 27.5g ac. Bórico, 20ml de EDTA 0.5M y se afora a 5L con agua bidestilada) se adicionaron 0.48g de agarosa. La mezcla se llevó hasta ebullición en un horno de microondas durante 260s. Se dejó enfriar y se adicionaron 5 μ l de bromuro de etidio (ETBR, 10mg/1ml, Sigma, No. de cat. E-8751) Una vez gelificado el gel se cargó la muestra disuelta en el amortiguador de carga (5 μ l de muestra, 1 μ l de amortiguador de corrida, 3.5 μ l de formaldehído y 10 μ l de formamida). El gel se corrió a voltage constante (5V/cm durante 3h) en el amortiguador de corrida (26.67 ml de acetato de sodio 3 M a pH 5.4; 41.2g de MOPS; 20ml de EDTA 0.5M y 43ml de NaOH 2N). Para la transferencia de RNA, el gel se lavó con DEPC 0.1% (0.1 ml dietil pirocarbonato en 100ml de agua); posteriormente, el gel se incubó en NaOH 0.05N durante 20min y finalmente se lavó con DEPC al 0.1%. Se eliminó completamente este último, se adicionó SSC (701.2g de NaCl y 352.8g de citrato de sodio se afora a 4L con agua bidestilada) tratado con DEPC y se incubó con agitación lenta durante 45min. La transferencia de RNA se hizo sobre una membrana de nylon y como amortiguador de corrida se usó SSC 10x .(701.2g de NaCl y 352.8g de citrato de sodio se afora a 4L con agua bidestilada) tratado con DEPC. El cDNA de la SGT fue donado por el Dr. Belknap.

VIII. RESULTADOS

Selección de clones

Se evaluó la tolerancia al calor en los tubérculos de papa de 10 clones: DTO-33, LT-5, LT-7, LT-8, LT-9, MF-II, TPS-7, TS-5, TS-9, TS-10, la progenie TS9 X TPS113 y Atlantic, que se utilizó como un control susceptible al estrés térmico. Esta evaluación se hizo mediante la técnica del goteo iónico, la cual permite determinar alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular a través de la medición de la liberación de electrolitos celulares al medio de incubación, como cambio en la conductividad eléctrica de dicho medio.

El tejido del tubérculo se incubó a 22, 30, 35, 40 y 50°C durante 4h y las lecturas se tomaron a intervalos de 30 min. El análisis del porcentaje de goteo iónico del tejido permitió encontrar diferencias en la permeabilidad de las membranas celulares en los diferentes clones analizados. Los resultados mostraron (Fig. 8.1) que a 22°C durante 150 min de incubación el goteo iónico del tejido de tubérculo varió de 19 a 40%; entre los diferentes clones el que mostró menos daño a temperatura ambiente fue TPS-7.

La permeabilidad de la membrana se incrementó bajo estrés por calor, pero los clones mostraron diferencias significativas entre sí para el incremento de la permeabilidad de la membrana cuando el tejido fue expuesto a temperaturas supraóptimas (35°C). Se detectó una progenie tan susceptible como TS9 X TPS113, que alcanzó más del 90% en el goteo iónico, así como un clón tan tolerante como DTO-33, en el cual el máximo daño detectado fue del

30%. El porcentaje de goteo iónico registrado en el resto de los clones estuvo entre estos dos valores.

Es importante destacar que no se encontró una relación sencilla entre los clones que manifestaron mayor estabilidad en permeabilidad de membrana a temperatura ambiente y los clones que mostraron menos goteo iónico bajo estrés por calor. Por ejemplo, Atlantic (Atl) es uno de los clones más estables en permeabilidad de membrana a temperatura ambiente; sin embargo, a 35°C está entre los clones que más daño sufrieron. En cambio, LT-9 y LT-7 fueron los clones más dañados a temperatura ambiente, pero no presentaron un goteo iónico muy elevado a 35°C (Fig. 8.1)

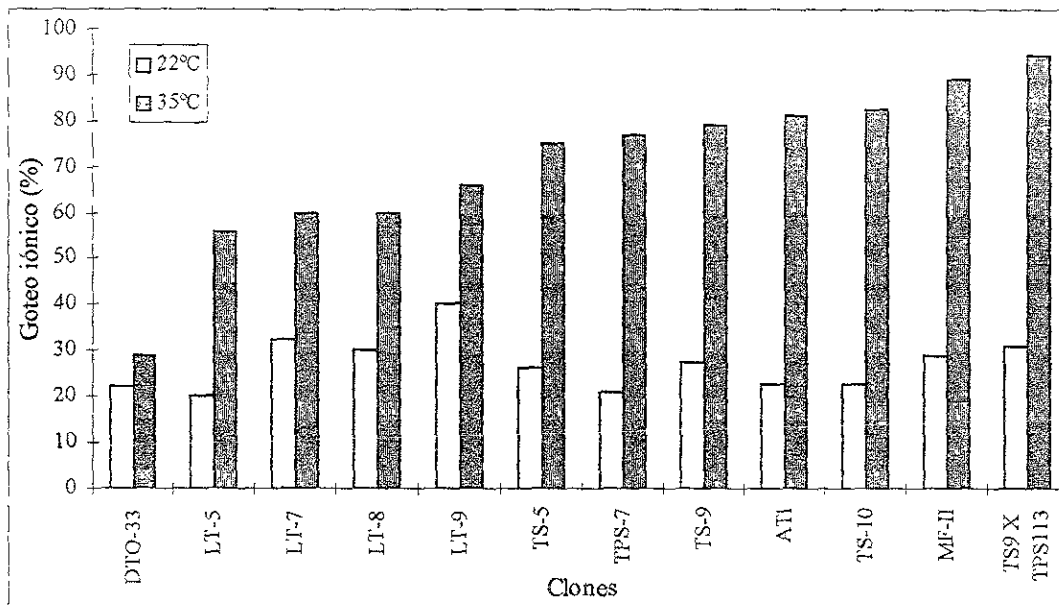


Fig. 8.1 Selección de clones mediante goteo iónico en tejido de tubérculo. El tejido se incubó durante 150 min a las temperaturas indicadas. Diferencia mínima significativa: $P < 0.1$

Para el presente trabajo se seleccionó DTO-33 como el clón resistente, Atlantic como susceptible, por ser un clón de importancia industrial en el país y LT-7 por presentar una respuesta intermedia al estrés térmico. De este modo, los experimentos incluyen clones contrastantes en estabilidad de permeabilidad de membranas celulares, lo cual permitió, como se verá después, determinar la ocurrencia de una interacción con los alcaloides adicionados exógenamente.

Efecto de la temperatura sobre la permeabilidad de la membrana celular

Una vez seleccionados los clones contrastantes en susceptibilidad al calor se prosiguió a realizar el análisis detallado del efecto de la temperatura sobre la permeabilidad de la membrana. El tejido de tubérculo de DTO-33, LT-7 y Atlantic se incubó a diferentes temperaturas y se evaluaron los cambios de permeabilidad de membrana por goteo iónico. En el tejido de DTO-33, el goteo iónico al tiempo cero fue del 10%; en cambio, para Atlantic y LT-7 fue del 20%. El daño en permeabilidad de membrana en el tejido de los tres clones aumentó con el incremento en la temperatura. A todas las temperaturas evaluadas, invariablemente la variedad más tolerante al calor fue DTO-33 y la más susceptible fue Atlantic, que mostró el máximo goteo iónico. El tiempo en que la permeabilidad de la membrana permaneció estable o sin aumento significativo en el goteo iónico a las diferentes temperaturas varió en los tres clones. En Atlantic, la estabilidad de la membrana se mantuvo constante solamente a 22°C, LT-7 fue termoestable a 22 y 30°C; en cambio, DTO-33 no mostró daños significativos a 22, 30 o 35°C, y sólo a 40°C sufrió un daño severo después de 90 min de incubación. La incubación del tejido a 50°C fue letal para los tres clones; sin embargo, en los primeros 30 min el tejido de DTO-33 presentó 40% de

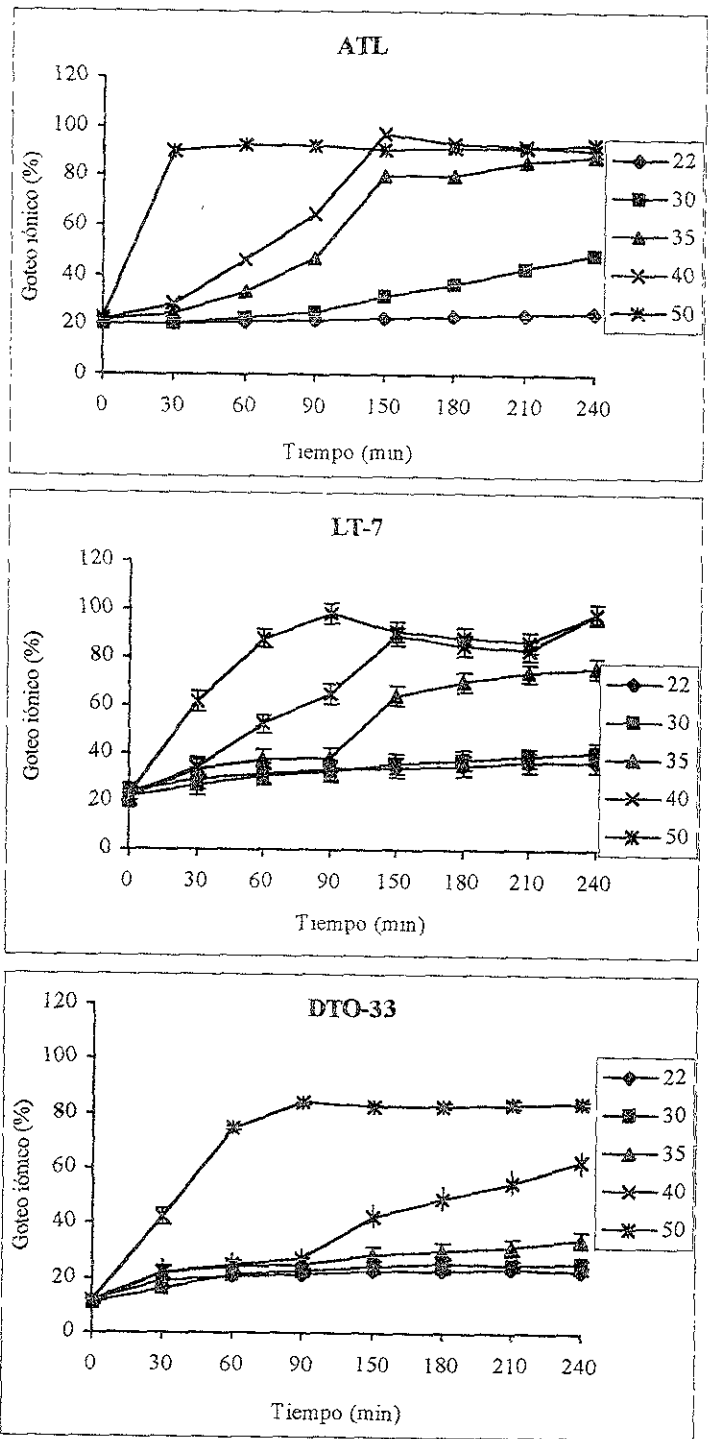


Fig. 8.2 Goteo iónico bajo estrés por calor a diferentes intervalos de tiempo. El tejido se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas, el goteo iónico se determinó a intervalos de 30min por conductimetría.

goteo iónico solamente, a diferencia de LT-7, en cuyo caso el goteo iónico alcanzó el 60% mientras que para Atlantic el daño fue del 90% (Fig. 8.2).

El porcentaje de goteo iónico en tejido de tubérculo de los tres clones durante 4h de incubación a diferentes temperaturas mostró un comportamiento interesante. Atlantic y LT-7 mostraron un goteo iónico similar y mayor alteración en la permeabilidad de membranas conforme se incrementó la temperatura. En cambio, DTO-33 fue consistentemente más tolerante bajo las mismas condiciones, a excepción de 50°C, temperatura a la cual los tres clones manifestaron un daño de la misma magnitud. Las diferencias más significativas entre clones se presentaron a 35°C: DTO-33 mostró menos del 30% de goteo iónico, mientras que en LT-7 y Atlantic este rebasó el 70% (Fig. 8.3).

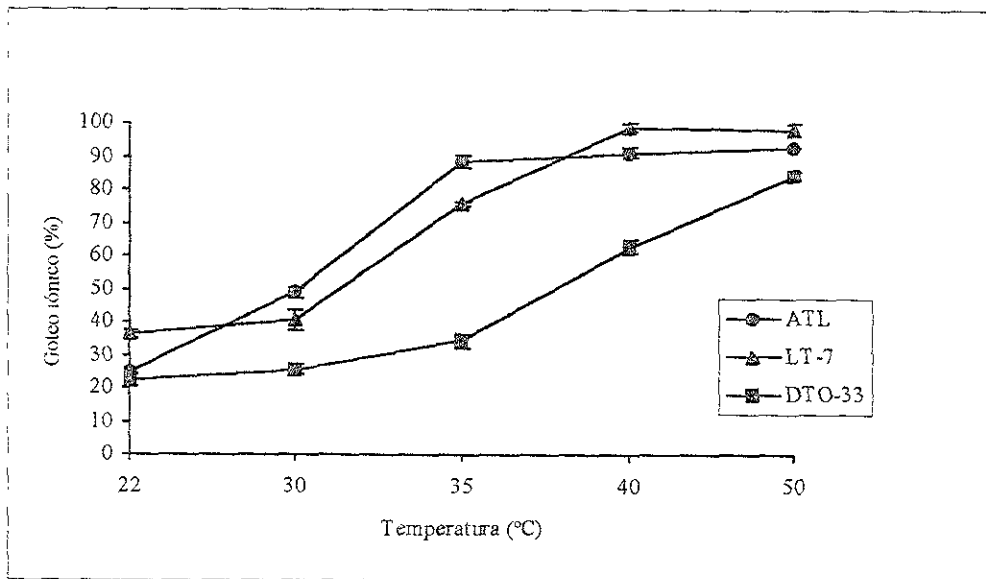


Fig. 8.3 Efecto de la temperatura sobre permeabilidad de membrana en el tejido de Atlantic (ATL), LT-7 y DTO-33. El tejido del tubérculo se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas.

Respiración bajo estrés térmico

La respiración es el factor limitante para el desarrollo normal de la planta de papa y del tubérculo bajo estrés térmico (Sarquis et al., 1996), por lo que se decidió analizar este fenómeno. En la prueba del TTC, las deshidrogenasas presentes en la célula utilizan como aceptor de electrones al cloruro-2,3,5-trifenilo de tetrazolio que compite con el oxígeno (aceptor final de electrones en la respiración) por los electrones. El tejido de Atlantic, LT-7 y DTO-33 durante 4h de incubación a 22°C mostró un poder reductor del 100%, pero a medida que se incrementó la temperatura, la capacidad del tejido de reducir TTC disminuyó, en otras palabras el tejido respiró menos. Como se esperaba, los clones manifestaron diferente sensibilidad a la temperatura en este aspecto. Sorpresivamente Atlantic, que es el clón más susceptible como lo mostró el grado máximo de goteo iónico sufrido luego del estrés térmico, mantuvo un nivel de reducción de TTC similar a DTO-33. En cambio LT-7 fue el cultivar más

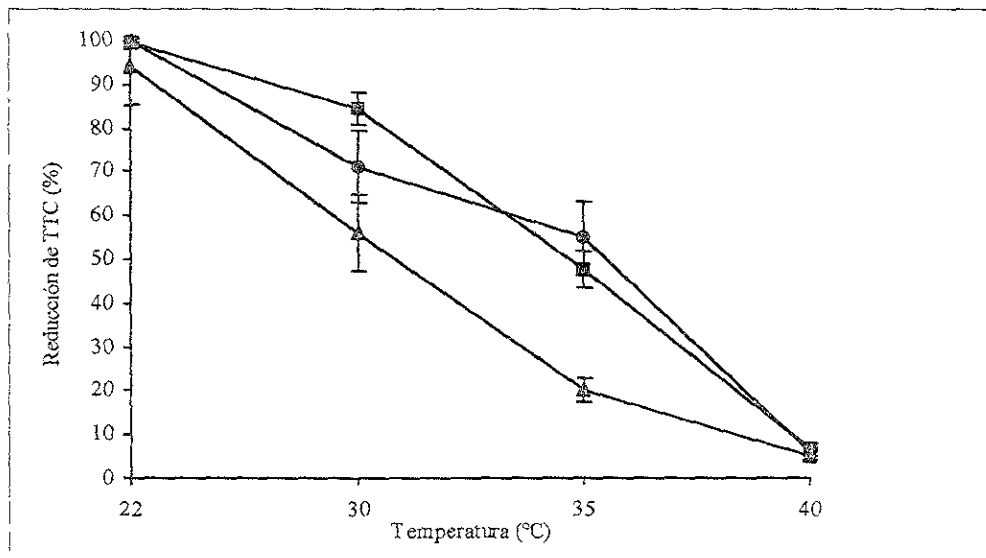


Fig. 8.4 Efecto de la temperatura sobre la respiración. El tejido de tubérculo se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas antes de medir la actividad reductora.

dañado a nivel de la respiración. A 40°C los tres clones perdieron la capacidad reductora de TTC casi totalmente (Fig. 8.4). Como en el caso del goteo iónico, la máxima diferencia en la capacidad reductora de TTC entre clones se observó a 35°C.

Para poder comparar con mayor facilidad los datos de goteo iónico y reducción de TTC obtenidos, se transformaron los resultados de porcentaje de la actividad deshidrogenasa a porcentaje de inhibición de dicha actividad, de tal manera que el incremento en goteo iónico e inhibición de la actividad deshidrogenasa se pudieran expresar como porcentaje de daño al tejido por el estrés térmico (4h de incubación a diferentes temperaturas). Los resultados mostraron que en Atlantic, el porcentaje de daño sobre permeabilidad de membrana fue más severo que sobre la actividad deshidrogenasa a todas las temperaturas probadas, a excepción de 40°C, temperatura a la cual se presentó un daño de la misma magnitud. En LT-7 el tejido sufrió el mismo daño a ambos niveles en todas las temperaturas, a excepción 22°C, temperatura a la cual no mostró daño sobre la actividad deshidrogenasa. En cambio, en DTO-33, aunque sigue siendo el clón más tolerante al estrés térmico, la actividad deshidrogenasa se vio más afectada respecto a la permeabilidad de membrana a 35 y 40°C (Cuadro 8.1). En general, se observó como previamente se han reportado (Ewing, 1981), que la permeabilidad de membrana y la respiración son muy susceptibles a temperaturas supraóptimas.

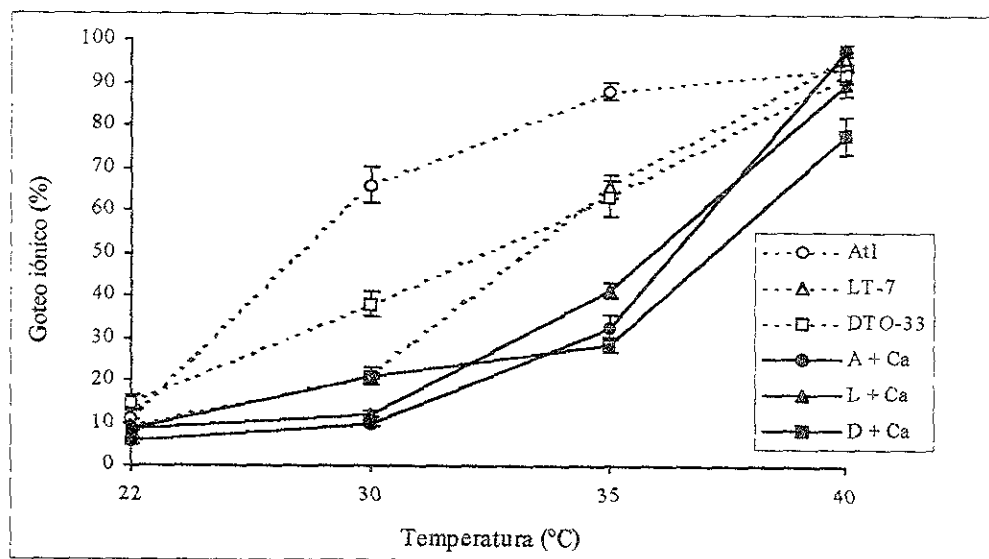
Cuadro 8.1. Porcentaje de daño en permeabilidad de membrana y respiración a temperaturas supraóptimas. El tejido se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas. Porcentaje de daño sobre permeabilidad de membrana (M), porcentaje de inhibición de la actividad reductora de TTC (DH).

PORCENTAJE DE DAÑO				
	22°C	30°C	35°C	40°C
A _M	25.1	48.8	88.5	91.0
A _{DH}	0.	25	46	92
L _M	36.4	40.7	75.8	98.7
L _{DH}	0	43.7	79.9	95
D _M	22.4	25.6	34.3	62.6
D _{DH}	0.4	15.2	52.2	93.1

Efecto del calcio sobre la permeabilidad de la membrana

Dado que hay indicios de un efecto protector del calcio sobre la membrana celular en condiciones de calor (Tawfik et al., 1996) se adicionó calcio al medio de incubación como un protector de la membrana. El objetivo de este tratamiento fue tratar de eliminar las diferencias manifestadas por efecto de la temperatura sobre la permeabilidad de la membrana en los tres clones y así poder analizar en forma independiente el efecto del calor sobre la respiración. Se presentaron problemas para medir goteo iónico en presencia del calcio en el conductímetro, pues a medida que se incrementaba la temperatura se hacían más negativos los valores, lo que

sugería que la célula estaba transportando el calcio a citoplasma, enmascarando el goteo iónico. Por este motivo se incubó el tejido en calcio durante 2h a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo se descartó el calcio, se lavó muy bien el tejido y posteriormente se incubó a diferentes temperaturas durante 4h. La preincubación del tejido con calcio 5 mM (previo análisis de curvas de dosis-respuesta) redujo significativamente el goteo iónico en los tres clones a 30 y 35°C, pero no a 40°C; este efecto benéfico fue consistentemente más grande en las membranas del tejido más dañado, como puede observarse en Atlantic. Lo interesante de este experimento es que se lograron eliminar las diferencias de susceptibilidad de



membrana entre clones (Fig. 8.5).

Fig. 8.5 Efecto del Calcio sobre permeabilidad de membrana. El tejido se incubó en una solución de calcio durante 2h a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el calcio y el tejido se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas.

Efecto del calcio sobre la respiración

El análisis del efecto de la adición de calcio sobre la reducción de TCC en tejido de tubérculo de los tres clones no fue sencillo. El tejido del tubérculo se incubó con CaCl_2 desde 0.1 hasta 10 mM en un volumen final de 3ml durante 4h a 22°C y se midió el porcentaje de reducción de TCC. Fue interesante la respuesta de los tres clones a las diferentes concentraciones de calcio, pues cada uno de ellos respondió diferente. En el tejido de Atlantic, a 22 y 30°C el calcio en lugar de proteger, dañó al tejido; sin embargo, a mayores temperaturas (35 y 40°C) sí protegió al tejido aún en concentraciones tan bajas como 1 mM, incluso se observó una recuperación del 100% a 35°C con una concentración de 5 mM; no así a 40°C, temperatura a la cual el tejido tratado sólo alcanzó un 70% de actividad de reducción del TCC del control.

El efecto protector del calcio en LT7 no fue tan claro como en Atlantic. Las diferentes concentraciones de calcio probadas fueron incapaces de recuperar la actividad deshidrogenasa al nivel previo al estrés térmico. A temperatura ambiente, 1 mM de calcio fue suficiente para que se presentara un decremento en la reducción de TCC del 50%; por arriba de esta concentración no se presentaron cambios significativos en la actividad reductora de TTC. En cambio, en DTO-33, a medida que se aumentó la concentración de calcio en el medio de incubación a 22 y 30°C, disminuyó la capacidad de reducción de TTC. A 35°C con 1 mM de calcio se recuperó el tejido, pero a medida que se incrementó la concentración nuevamente descendió la actividad. Sin embargo, a 40°C el incremento en la concentración de calcio en el medio resultó en una tendencia a recuperar la capacidad de reducción de TTC por el tejido (Fig. 8.6).

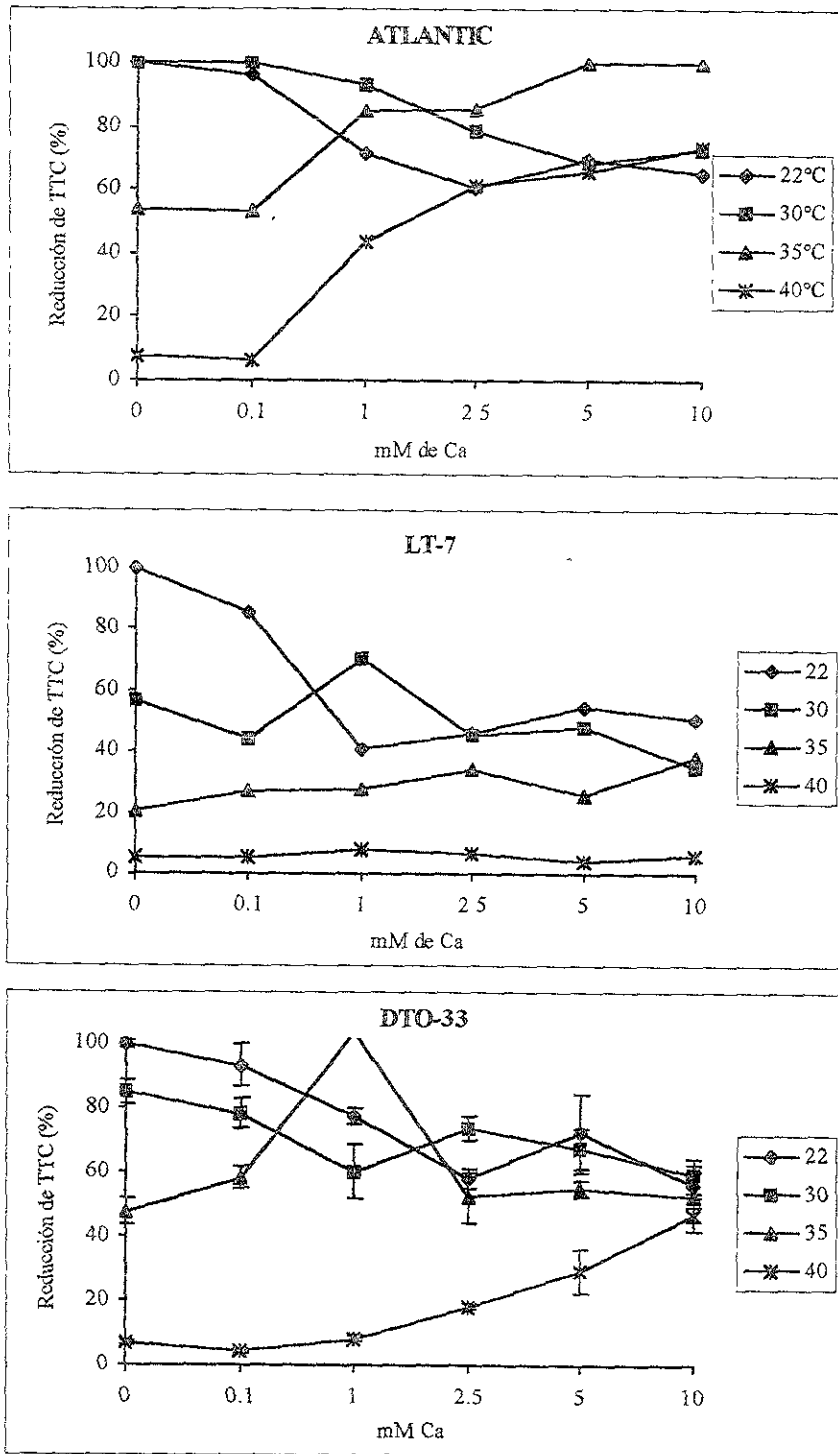


Fig. 8.6 Curvas de dosis-respuesta para el efecto del calcio sobre la respiración. El tejido se incubó en calcio durante 4h a las temperaturas indicadas.

La presencia de calcio 5 mM en el medio tuvo un efecto dañino en los tres clones cuando se incubaron durante 4h a temperatura ambiente. No se presentó un efecto importante en el resto del gradiente térmico, a excepción de Atlantic, que manifestó una notable recuperación de la reducción de TTC a 35°C y en menor grado a 40°C. En DTO-33 se presentó una leve recuperación por calcio a 40°C (Fig. 8.7).

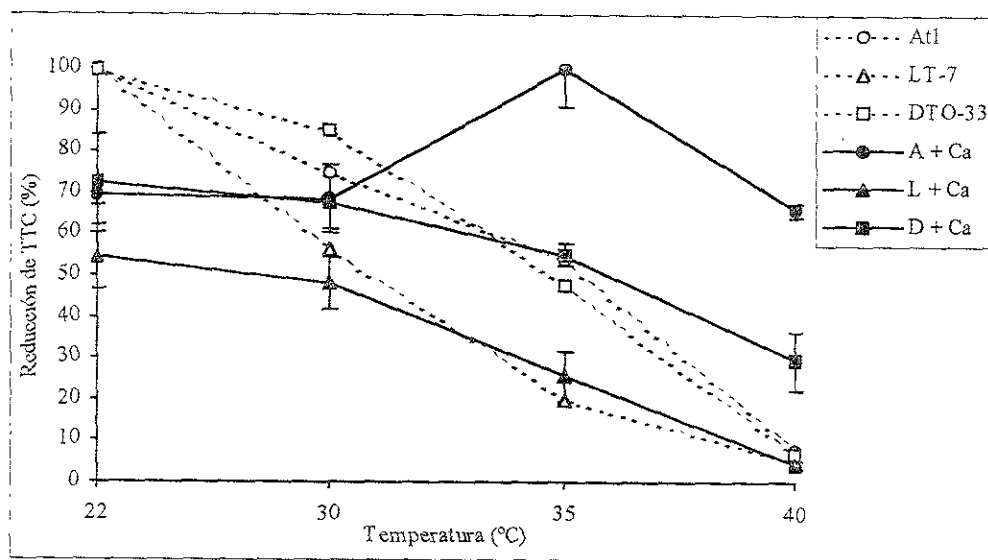


Fig. 8.7 Efecto del calcio sobre la respiración en tejido de tubérculo. El tejido se incubó con calcio 5 mM durante 4h a las temperaturas indicadas antes de medir actividad reductora de TTC.

Efecto de los alcaloides sobre la respiración

En la Fig. 8.8 se muestran las curvas de dosis-respuesta de la adición de la mezcla de los tres alcaloides en concentraciones equimolares durante 4h de incubación a temperatura ambiente.

En general, la adición de alcaloides inhibió más severamente la reducción de TTC en el tejido de Atlantic que en el de DTO-33 o el de LT-7. Una concentración 10 μM de alcaloides fue suficiente para alterar el metabolismo del tejido de Atlantic y a 50 μM de alcaloides este clón disminuyó su capacidad reductora de TTC en un 50%, mientras que en LT-7 y DTO-33 la reducción de TTC bajo las mismas condiciones fue de 86 y 73.5%, respectivamente. A mayores concentraciones el efecto de los alcaloides no cambió significativamente, a excepción de cuando el tejido de LT-7 se incubó a 250 μM , caso en el que se presentó una actividad reductora de TTC del 30% respecto al control.

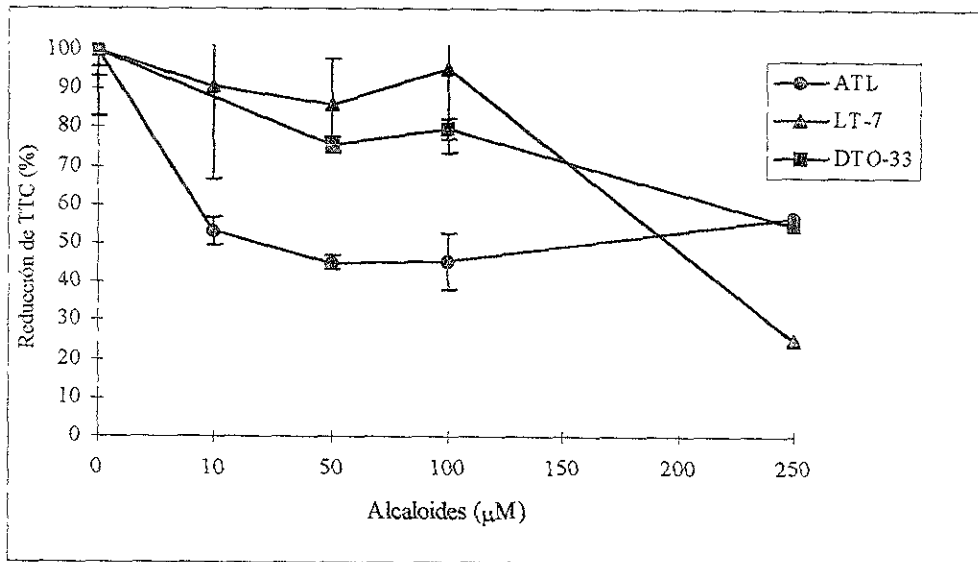


Fig. 8.8 Curva de dosis-respuesta para el efecto de los alcaloides sobre la respiración. El tejido de tubérculo se incubó durante 4h a temperatura ambiente en una mezcla equimolar de solanina, chaconina y solanidina a las concentraciones indicadas.

El efecto de la adición de alcaloides en el medio de incubación del tejido fue estable. Desde las primeras dos horas de incubación del tejido con los alcaloides se alcanzó el máximo efecto y este permaneció constante durante las 8h que duró el experimento (Cuadro 8.2).

Cuadro 8.2 Efecto de la adición de alcaloides sobre la respiración en tejido de tubérculo de Atlantic a diferentes intervalos de tiempo.

Concentración	Porcentaje de la actividad deshidrogenasa			
	2h	4h	6h	8h
0 μ M	100 \pm 4.5	98 \pm 4.0	100 \pm 1.5	100 \pm 5.5
Alk 10 μ M	65 \pm 5.0	53 \pm 4.0	58 \pm 2.3	63 \pm 1.0
Alk 50 μ M	66.6 \pm 3.6	65 \pm 1.8	45.3 \pm 9.2	60 \pm 3.8

Efecto de la adición de alcaloides en tejido de tubérculo sujeto a estrés por calor

La capacidad de reducción de TTC se mantuvo al 100% después de que el tejido se incubó durante 4h a temperatura ambiente (22°C). Al igual que en los resultados anteriormente descritos, el incremento en la temperatura disminuyó la capacidad reductora del tejido. El clón más dañado fue LT-7. La incubación de Atlantic y DTO-33 en mezcla de alcaloides 50 μ M a temperatura ambiente durante 4h resultó en una actividad reductora del 58 y 80%, respectivamente. La reducción de TTC en LT-7 no se alteró bajo las mismas condiciones. En el caso de Atlantic y DTO-33 la presencia de alcaloides en el medio de incubación provocó un

daño adicional al tejido al provocado por el estrés térmico (30 y 35°C); sin embargo, la adición de alcaloides al medio de incubación no causó cambios significativos en el caso de LT-7 (8.9).

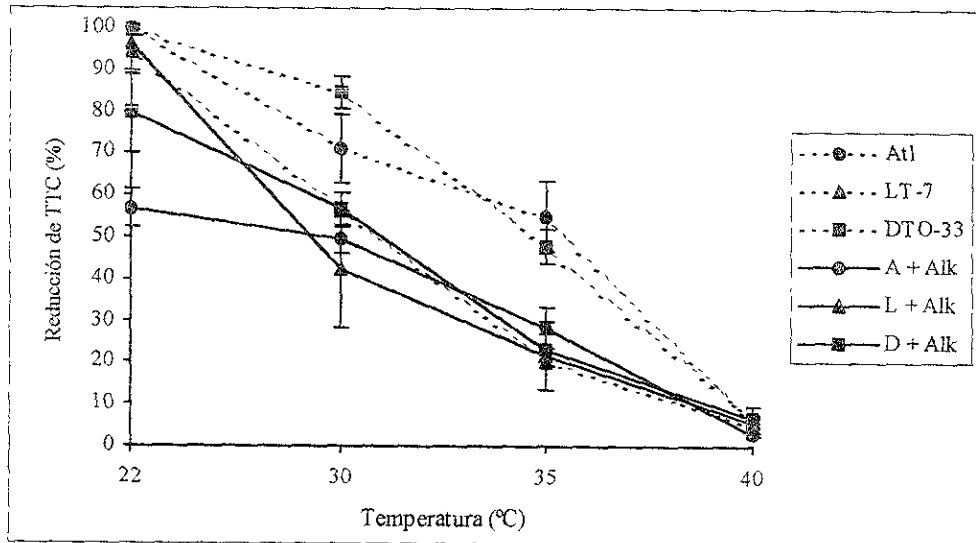


Fig. 8.9 Efecto de los alcaloides sobre la respiración en tejido incubado a temperaturas supraóptimas. El tejido de tubérculo se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas en una mezcla equimolar de solanidina, solanina y chaconina a una concentración final de 50 μ M.

Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre la permeabilidad de la membrana

Al utilizar tubérculos frescos de los tres clones de una nueva cosecha se obtuvieron resultados un tanto diferentes a los observados anteriormente. Por ejemplo, el goteo iónico en tejido incubado a temperatura ambiente y bajo estrés térmico fue mayor en DTO-33, indicando ser el clon más susceptible, contrario a los resultados anteriormente descritos. Por otra parte, la adición de calcio al medio de incubación consistentemente disminuyó el goteo iónico del tejido en todos los casos, pero su efecto benéfico fue mayor en el tejido más dañado, de tal

forma que el tejido incubado a temperatura supraóptima mostró la mayor recuperación en la permeabilidad de membrana en presencia de calcio. Sin embargo, la protección por calcio bajo estrés térmico no fue del 100%, pues el porcentaje de goteo iónico no llegó a los niveles iniciales (temperatura ambiente), excepto en el caso de DTO-33. La adición de alcaloides no tuvo efecto significativo sobre el goteo iónico. Sorpresivamente se observó una tendencia a disminuirlo sobre todo en las membranas más dañadas como es el caso del tejido incubado a temperatura supraóptima; de tal forma que la adición simultánea de calcio y alcaloides protegió mejor la permeabilidad de membrana que en forma independiente (Cuadro 8.3).

Cuadro 8.3 Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre permeabilidad de membrana en tejido de tubérculo de papa almacenados por un mes. El tejido se preincubó en presencia de calcio (Ca) o de alcaloides (Alk) durante 2h, posteriormente se lavó y se incubó a 22 o a 35°C durante 4h.

Porcentaje de goteo iónico						
	22°C			35°C		
	Atlantic	LT-7	DTO-33	Atlantic	LT-7	DTO-33
Control	6.8 ± 0.3	5.6 ± 0.7	18.3 ± 0.1	69.7 ± 0.6	42.1 ± 4.7	75.0 ± 3.1
Ca	5.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	9.0 ± 0.4	25.6 ± 0.3	8.4 ± 0.4	13.8 ± 3.7
Alk	6.6 ± 0.1	5.6 ± 0.3	13.8 ± 4.0	63.6 ± 0.3	33.1 ± 4.3	58.4 ± 3.2
Ca + Alk	5.7 ± 0.8	3.9 ± 0.6	7.5 ± 0.8	23.1 ± 4.4	8.1 ± 0.1	8.8 ± 0.3
Ca - C	-1.6	-1.2	-9.3	-44.1	-33.7	-61.2
Alk - C	-0.2		-4.5	-6.1	-9.0	-16.6

Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre la respiración

El incremento en la inhibición de la actividad deshidrogenasa en el tejido fresco de los tres clones incubado a temperatura elevada fue del mismo orden de magnitud. El calcio inhibió la actividad deshidrogenasa a temperatura ambiente, pero protegió al tejido estresado. La adición de alcaloides a temperatura ambiente inhibió la actividad deshidrogenasa en Atlantic y LT-7 pero no en DTO-33. La adición de alcaloides a 35°C no afectó significativamente la actividad deshidrogenasa en Atlantic y DTO-33; pero en LT-7 recuperó dicha actividad. Juntos, calcio y alcaloides, a temperatura ambiente dañaron más la actividad deshidrogenasa que en forma independiente. En el tejido estresado los alcaloides modificaron la capacidad protectora del calcio (Cuadro 8.4).

Goteo iónico en tejido almacenado por diferentes periodos de tiempo

La falta de reproducibilidad de la respuesta del tejido a la adición de calcio y alcaloides nos condujo a hacer un análisis de goteo iónico en el tejido de los tubérculos que fueron almacenados durante diferentes períodos, para ver si el tiempo de almacenamiento influye sobre la respuesta del tejido a nivel de membrana al calcio o a la adición exógena de alcaloides. Como el estrés térmico acelera el envejecimiento del tejido y el tiempo de almacenamiento hace lo mismo, es posible encontrar diferencias en la respuesta a la adición de calcio o alcaloides en el tejido de diferentes edades.

Tubérculos de uno, siete y nueve meses de almacenamiento se incubaron durante 2h con calcio, alcaloides o ambos a 22°C, después de este período se eliminaron el calcio y los alcaloides, se lavó el tejido y se incubó durante 4h a 22°C o a 35°C.

Cuadro 8.4 Efecto de la adición de calcio y alcaloides sobre la respiración en tubérculos de papa almacenados por un mes. El tejido se preincubó en presencia de calcio (Ca) o de alcaloides (Alk) durante 2h, posteriormente se lavó y se incubó a 22 o a 35°C durante 4h.

Porcentaje de inhibición de la actividad deshidrogenasa						
	22°C			35°C		
	Atlantic	LT-7	DTO-33	Atlantic	LT-7	DTO-33
C	0 ± 0.2	0 ± 0.5	0 ± 1.0	54.7 ± 2.0	61.1 ± 2.0	50 ± 4.0
Ca	22.4 ± 0.2	42.2 ± 3.0	18.5 ± 1.0	26.3 ± 8.0	43.6 ± 2.0	34.8 ± 2.0
Alk	24.6 ± 3.0	17.5 ± 0.4	0 ± 5.0	52.8 ± 1.0	13.2 ± 4.0	52.8 ± 3.0
Ca + Alk	44.6 ± 6.4	46.3 ± 0.5	5.1 ± 2.0	32.9 ± 5.0	34.5 ± 0.2	30 ± 2.0
Ca - C	- 21.4	+ 41.2	+ 17.5	- 28.4	- 17.5	- 15.2
Alk - C	+ 23.4	+ 16.5		- 1.9	- 47.9	+ 2.8

Los resultados indicaron que el goteo iónico varió según el tiempo de almacenamiento del tejido. El tejido de los tubérculos más jóvenes mostró los niveles más bajos de goteo iónico. El estrés térmico incrementó este goteo, pero el tejido joven lo resistió mejor independientemente del genotipo. La adición de calcio 5 mM redujo los niveles de goteo en todos los casos; sin embargo, el porcentaje de recuperación fue proporcional al daño de la membrana, aunque su eficiencia disminuyó en el tejido que alcanzó niveles de goteo iónico cercanos al 100%.

El efecto de la adición de alcaloides sobre la permeabilidad de membrana a temperatura ambiente no dependió del genotipo, sino más bien de la estabilidad de la membrana, de tal

forma que la adición de alcaloides al tejido que mostró goteo iónico elevado (tejido más viejo) incrementó aún más el goteo iónico. En tejido que mostró goteo iónico limitado, es decir tejido joven, la adición de alcaloides resultó en una tendencia a disminuir el goteo iónico. En cambio, cuando el tejido se incubó a 35°C, la adición de alcaloides no afectó significativamente el goteo iónico, aunque se observó una tendencia de este a disminuir en ese caso. A temperatura ambiente, la presencia de calcio atenuó el efecto dañino de los alcaloides, El goteo iónico del tejido incubado simultáneamente con calcio y alcaloides fue superior al del tejido incubado solamente con calcio, lo que indica que el efecto benéfico del calcio no contrarrestó totalmente el efecto dañino de los alcaloides. Sorpresivamente, la incubación del tejido a temperaturas supraóptimas con calcio y alcaloides resultó en un goteo iónico inferior al del tejido incubado solamente con calcio, lo cual indicaría que los alcaloides contribuyen a disminuir el goteo iónico. Es importante notar que el calcio y los alcaloides se unen a la membrana de forma estable, tanto que la eliminación del calcio y los alcaloides, y el posterior lavado del tejido, no son suficientes para eliminar su efecto (Cuadro 8.5).

Cuadro 8.5 Permeabilidad de membrana en tubérculos almacenado durante diferentes períodos de tiempo. El tejido de tubérculos almacenados por 1, 7 o 9 meses se incubó durante 2h con calcio o alcaloides a 22°C, posteriormente se incubó durante 4h a 22 o 35°C.

Porcentaje de goteo iónico (22°C)									
ATLANTIC			LT-7			DTO-33			
Meses	1	7	9	1	7	9	1	7	9
C	6.8	38.2	12	5.6	53	35.6	18.3	55.5	36.3
Ca	5.2	8.3	3.6	4.4	15.5	16.1	9	23.6	31.8
Alk	6.6	67.8	10.8	5.6	72	52.4	13.8	56.6	40.9
Ca+Alk	5.7	23.2	9.35	3.9	39.9	24.3	7.5	31.9	35.2
Ca - C	- 1.6	- 30.1	- 8.4	- 1.2	- 37.5	- 19.5	- 9.3	- 31.9	- 5.5
Alk - C	- 0.2	+ 29.6	- 1.2	--	+ 19	+ 16.8	- 4.5	+ 1.1	+ 11

Porcentaje de goteo iónico (35°C)									
ATLANTIC			LT-7			DTO-33			
Meses	1	7	9	1	7	9	1	7	9
C	69.7	96.5	67.8	42.1	92.4	91.9	75	98.6	94.1
Ca	25.6	80.5	45.4	8.4	89.1	82.2	13.8	87.2	79.9
Alk	63.6	94.6	70.1	33.1	96.5	100	58.4	91.7	90.2
Ca+Alk	23.1	77.6	50.2	8.1	81.6	100	8.8	94.7	95.7
Ca - C	- 44.1	- 6.0	- 22.4	- 33.7	- 3.3	- 9.7	- 6.12	- 11.4	- 14.2
Alk - C	- 6.1	- 1.9	+ 2.3	- 9.0	+ 4.1	+ 8.1	- 16.6	- 6.9	- 3.9

Concentración de alcaloides endógenos

La Fig. 8.10 muestra la concentración de alcaloides individuales extraídos del tejido de tubérculo. La concentración de alcaloides endógenos totales a temperatura ambiente fue del mismo orden de magnitud en los tubérculos de papa de los tres clones analizados. Sin embargo, la concentración de alcaloides cambió con el tiempo de almacenamiento; por ejemplo, en el tejido de Atlantic y DTO-33 la concentración disminuyó con el tiempo de almacenamiento, los niveles de alcaloides en estos dos clones fueron muy similares. En cambio, en LT-7 no se observó un patrón claro, pero a temperatura ambiente fue el clón que presentó la concentración más alta de alcaloides totales. Bajo estrés por calor, la concentración de alcaloides totales en DTO-33 disminuyó consistentemente pero en LT-7 y Atlantic no se observó un patrón claro.

La concentración de alcaloides totales no refleja el potencial tóxico que pueden tener éstos sobre las membranas (Roddick y Rijnenberg, 1986; Blankemeyer et al, 1992). La α -chaconina es el alcaloide potencialmente más efectivo en la destrucción de la membrana, pero combinada con la α -solanina, ambos pueden actuar sinérgicamente. Si en lugar de ver las concentraciones absolutas de los alcaloides individuales las expresamos en términos del potencial tóxico que pueden representar las concentraciones relativas de ellos, entonces podemos observar los siguientes resultados: en Atlantic y DTO-33 la chaconina disminuyó con el tiempo de almacenamiento; en cambio en LT-7 se incrementó. De tal forma que puede concluirse que en Atlantic y DTO-33 disminuyó la toxicidad de los alcaloides con el tiempo de

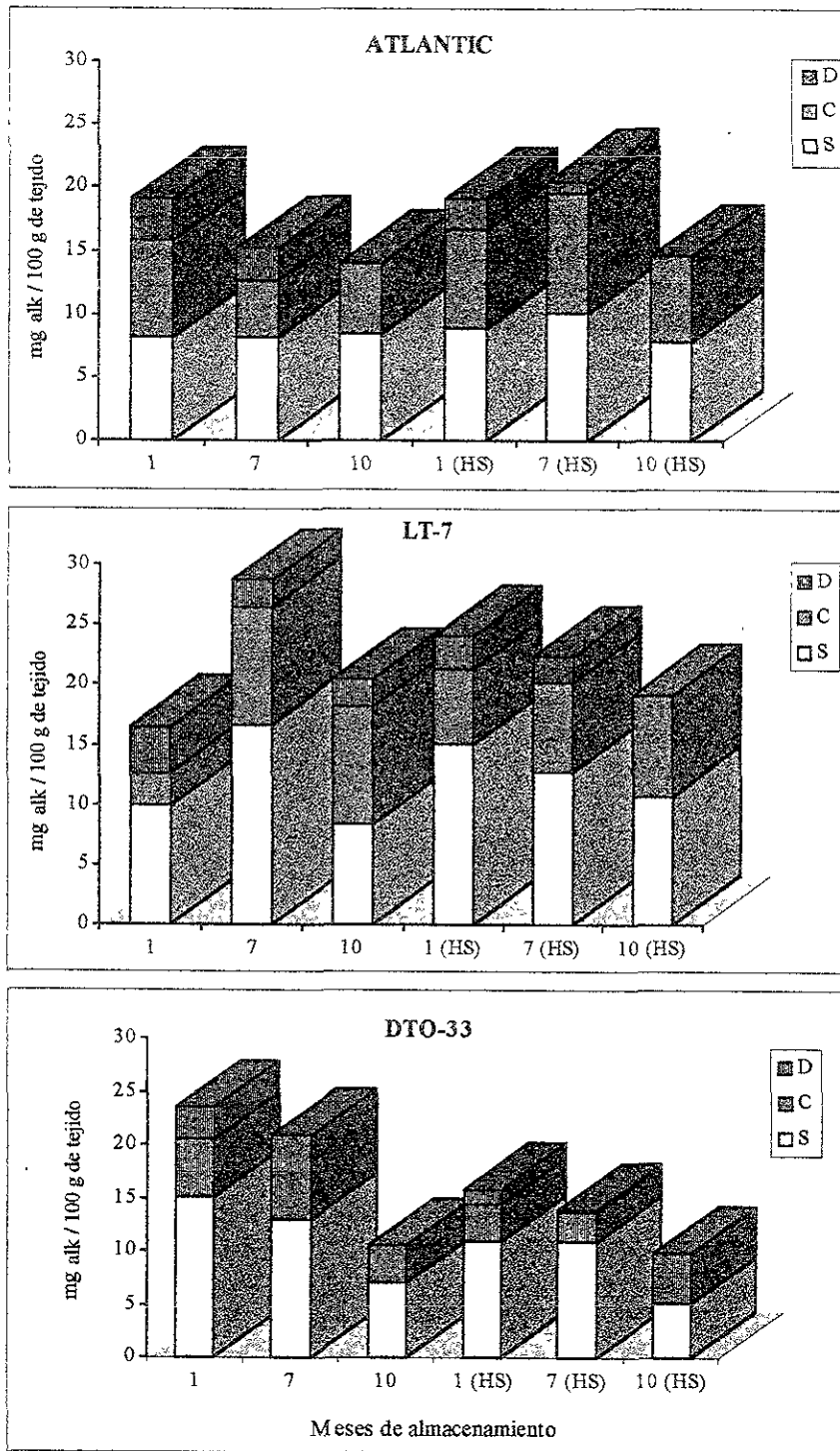


Fig. 8.10 Concentración endógena de alcaloides. El tejido de tubérculo de diferentes meses de almacenamiento se incubó durante 4h a temperatura ambiente o 35°C (HS). Posteriormente se realizó la extracción, purificación y cuantificación de los alcaloides del tejido.

almacenamiento, pero dicha toxicidad se incrementó en LT-7. Cuando el tejido de los tubérculos de los tres clones se incubaron a temperaturas supraóptimas se pudo observar que el estrés térmico incrementó el potencial tóxico de los alcaloides en el tejido de Atlantic, en LT-7 no cambió y en DTO-33 disminuyó. Es importante resaltar los cambios ocurridos en la concentración de solanidina en los diferentes clones: ésta mostró tendencia a disminuir con el tiempo de almacenamiento y bajo estrés térmico.

Fósforo inorgánico

El análisis de los niveles de fósforo inorgánico (Pi) en el tejido de los tres clones mostró que la concentración fue diferente entre ellos. En el primer mes de almacenamiento y su posterior incubación a 22°C durante 4h, el tejido de Atlantic fue el que presentó la concentración más baja, mientras que el nivel más alto se presentó en DTO-33. Estas concentraciones se modificaron en el transcurso del tiempo. La concentración de Pi se incrementó en Atlantic y DTO-33, mientras que en LT-7 la concentración permaneció constante hasta los 10 meses de almacenamiento que duró el experimento. La incubación del tejido durante 4h a 35°C incrementó ligeramente los niveles de Pi; este incremento se observó en los tres clones, pero el porcentaje del incremento dependió del genotipo y del tiempo de almacenamiento.

La incubación del tejido a 35°C incrementó más los niveles de Pi en los tejidos más jóvenes (1 mes de almacenamiento) independientemente del clon que se tratara. Sin embargo, LT-7 fue el clón que mayor porcentaje de aumento presentó en Pi en respuesta al estrés térmico (49%) (Fig. 8.11).

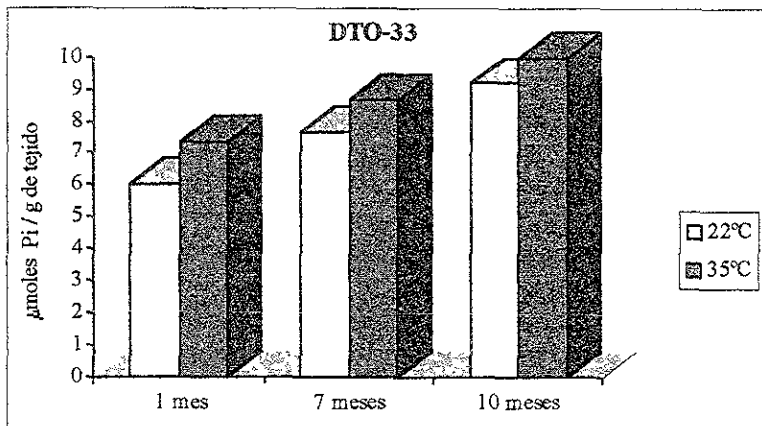
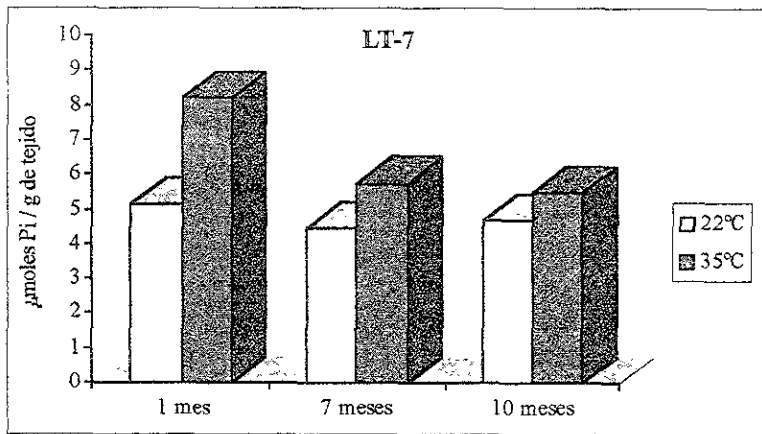
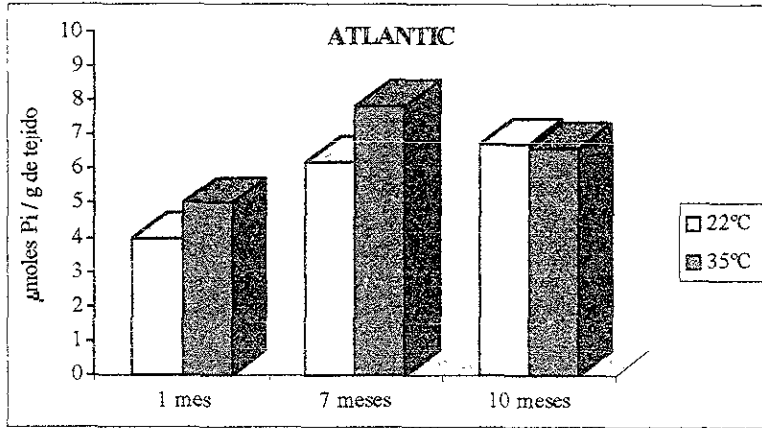


Fig. 8.11 Concentración endógena de Pi. El tejido de tubérculos almacenados por diferentes periodos de tiempo se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas para posteriormente realizar la extracción de Pi del tejido.

Efecto del estrés térmico sobre la concentración de azúcares y almidón

Los resultados anteriormente descritos sugieren que efectivamente los alcaloides alteran la permeabilidad de las membranas celulares, por lo cual se procedió a determinar la concentración de los principales carbohidratos del tubérculo de la papa para ver si los cambios en la permeabilidad de la membrana afectaban su concentración. El tejido de tubérculo de Atlantic estresado durante 4h a 35°C no mostró cambios en la concentración de almidón, a temperatura ambiente se registraron 67g/100g de tejido fresco y bajo estrés se detectó la misma cantidad. La concentración total de azúcares libres disminuyó ligeramente en el tejido incubado a 35°C durante 4h, pero el único azúcar que cambió fue la glucosa (Cuadro 8.6.)

Cuadro 8.6 Concentración de azúcares libres y almidón. El tejido del tubérculo se incubó durante 4h a las temperaturas indicadas antes de hacer la extracción de azúcares y almidón. Atlantic (Atl)

g/100g de tejido					
	Glucosa	Sacarosa	Fructosa total	Σ	Almidón
Atl (22°C)	0.296 \pm 0.01	0.137 \pm 0.04	0.077 \pm 0.003	0.510	67
Atl (35°C)	0.235 \pm 0.01	0.154 \pm 0.01	0.074 \pm 0.01	0.463	67

Diversas observaciones han mostrado que diferentes formas de estrés inducen cambios en la concentración de carbohidratos (Sowokinos, 1990). Una posible interpretación de la falta de

correlación de nuestros resultados podría ser que no se dió el tiempo necesario de estrés al tejido para que se pudieran detectar cambios importantes en la concentración de carbohidratos. Por tal motivo se decidió incubar el tejido por periodos más largos. Cuando el tejido se incubó durante 24h a temperatura ambiente o a 35°C, se logró observar cambios significativos.

La concentración de almidón fue diferente en los tres clones, Atlantic tuvo los niveles más altos y DTO-33 los más bajos. Bajo estrés térmico, el almidón disminuyó notablemente independientemente del clón que se tratara; sin embargo, LT-7 fue el clón que presentó mayor porcentaje en la disminución de almidón.

La concentración de glucosa, sacarosa y fructosa también fue diferente entre clones, la sumatoria de la concentración de estos tres azúcares fue mayor en Atlantic y la más baja se detectó en LT-7. La incubación del tejido a 35°C durante 24h modificó la concentración de azúcares libres: en Atlantic y DTO-33 bajó la concentración mientras que en LT-7 se incrementó ligeramente. En cuanto a la concentración de alcaloides totales, DTO-33 fue el clón que presentó la concentración más alta a temperatura ambiente y Atlantic la más baja, bajo las mismas condiciones. El estrés térmico modificó estos niveles en los tres clones. Invariablemente los alcaloides disminuyeron; esta disminución se reflejó no solamente en la concentración total de los alcaloides, sino también en los alcaloides individuales. Tanto la solanina, como la chaconina y la solanidina disminuyeron con el estrés térmico en la misma proporción. Es importante hacer notar que las concentraciones de almidón y alcaloides correlacionaron negativamente entre sí (Fig. 8.12).

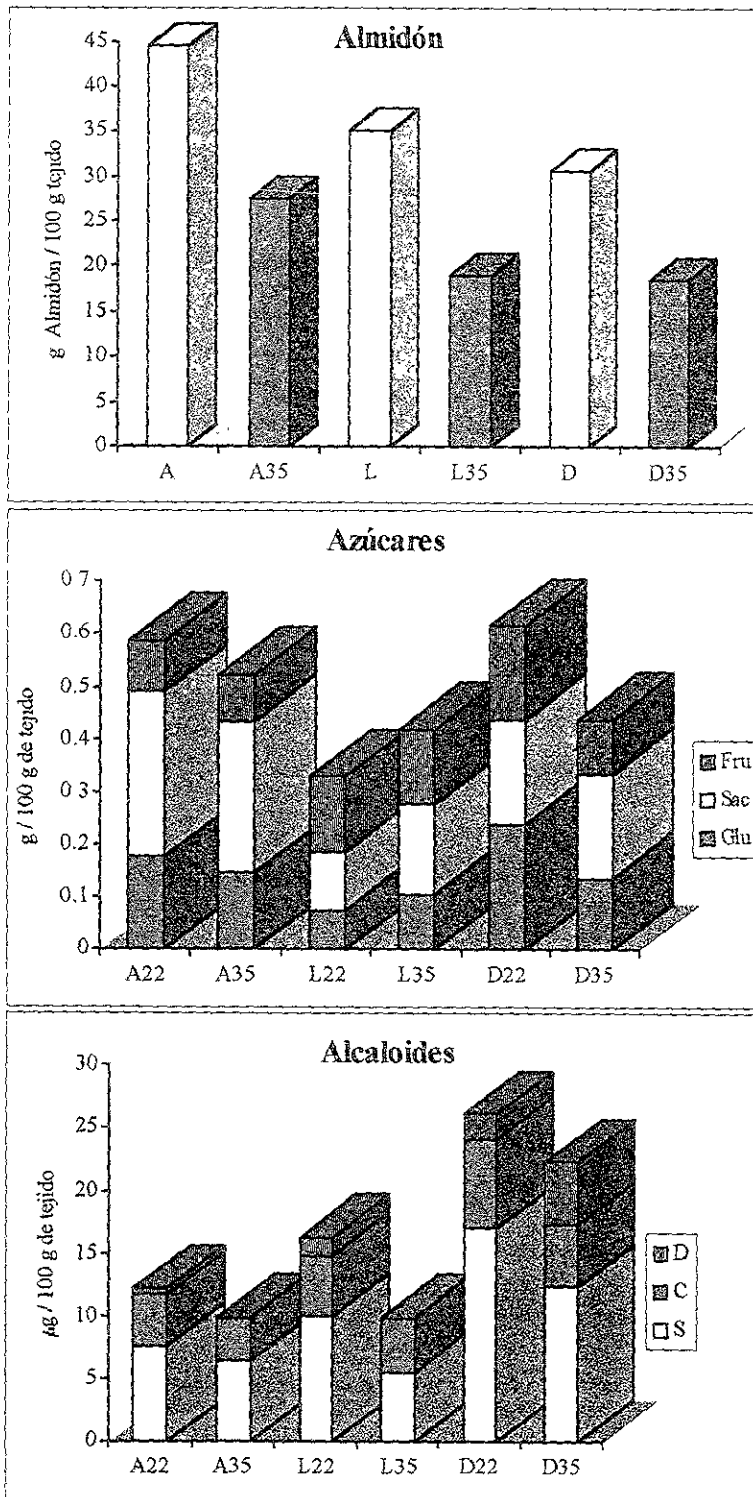


Fig. 8.12 Concentración endógena de almidón azúcares y alcaloides. El tejido de los tubérculos almacenados por 7 meses se incubó a 22 o 35°C durante 24h.

IX. DISCUSIÓN

Alteraciones en la permeabilidad de la membrana y su posterior destrucción han sido establecidas como efecto primario del daño celular inducido por temperaturas supraóptimas en numerosas especies de plantas (Raison et al., 1980; Hwei-Hwang et al., 1982; Thebud y Santarius, 1982; Wu y Wallner, 1984). En el presente estudio, el análisis de los cambios de permeabilidad de membrana permitió seleccionar clones contrastantes en susceptibilidad y tolerancia a calor (Fig. 8.1); los resultados fueron muy alentadores pues pudimos observar dentro de una misma especie diferencias en goteo iónico que se han reportado en distintas especies vegetales características de diversos hábitats (King et al., 1982).

El goteo iónico aumentó en el tejido de tubérculo de los tres clones con el incremento en la temperatura, indicando cambios en la permeabilidad de las membranas celulares por efecto del estrés térmico. El cultivar más tolerante al calor fue DTO-33 y el más susceptible fue Atlantic (Fig. 8.2). El análisis de los resultados en periodos relativamente largos de incubación del tejido bajo estrés (4h) mostró que el goteo fue similar en Atlantic y LT-7 a las diferentes temperaturas probadas y DTO-33 se mantuvo como el clón más tolerante bajo las mismas condiciones (Fig. 8.3). Lo anterior indica que la temperatura de incubación es tan importante como el tiempo de exposición a ésta. La selección de Atlantic como clón susceptible además es apoyada por la incapacidad de la planta para desarrollarse óptimamente y por producir microtubérculos en climas cálidos (Sarquís et al., 1996). DTO-33 es reconocido mundialmente como uno de los clones más tolerantes al estrés por temperaturas supraóptimas (Kadian et al., 1996).

El análisis del goteo iónico no indica a qué pueden deberse las diferencias clonales observadas; sin embargo, los resultados observados de la recuperación de la membrana por incubación en medio adicionado con calcio, así como el efecto de la aplicación exógena de alcaloides sugieren que las diferencias encontradas en la termoestabilidad de la membrana se deben a que la composición estructural de la membrana es diferente en cada caso, o que los factores que regulan los cambios de dicha composición en respuesta al estrés térmico actúan más rápido sobre el clón tolerante al calor que en el caso del clón más susceptible. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la composición química de la membrana es modificada por cambios en temperatura ambiental. Estos cambios son requeridos para mantener la fluidez de la membrana dentro de los estrechos límites que le permiten llevar a cabo sus funciones eficientemente cuando los factores ambientales cambian (Quinn, 1988). Se sabe que los cambios en permeabilidad de membrana influyen en la compartimentalización celular de metabolitos que a su vez alteran actividades enzimáticas, como por ejemplo, las deshidrogenasas (DHs), cuya actividad está principalmente involucrada en la respiración. Al respecto, el tejido de los tres clones incubados a 22°C durante 4h mostró una respiración del 100% que disminuyó linealmente conforme se incrementó la temperatura. Es claro que altas tasas de respiración no necesariamente indican tolerancia al calor, ya que Atlantic, que es el clón más susceptible al calor mostró una actividad reductora tan alta como la de DTO-33 (Fig. 8.4).

Es difícil separar el daño provocado por altas temperaturas sobre la permeabilidad de la membrana de la inhibición de la respiración; sin embargo, sí se puede afirmar que el incremento en la permeabilidad de la membrana está más relacionado con la susceptibilidad del tejido a temperaturas supraóptimas que a la inhibición de la respiración bajo estas condiciones experimentales. El efecto del estrés térmico sobre la permeabilidad

de membrana y la respiración no tienen una relación tan sencilla como lo sugieren Hwei-Hwang et al. (1982), quienes reportaron daños de la misma magnitud en la reducción de TTC y goteo iónico. En cambio, en el presente trabajo se muestra que Atlantic se daña más a nivel de membrana, LT-7 sufre el mismo daño a ambos niveles y en DTO-33 se observó más daño a nivel de la respiración, aunque el daño fue menor que en LT-7 (Cuadro 8.1), lo que indica que el daño por el estrés térmico sobre las membranas, al menos en parte, es independiente de la inhibición de la respiración inducida también por calor.

La preincubación del tejido con calcio 5mM claramente tuvo un efecto benéfico sobre la permeabilidad de membrana en el tejido de los tres clones. Este efecto fue consistentemente mayor en las membranas del tejido más dañado, independientemente del clon que se tratara; de tal forma, que el calcio disminuyó más el goteo iónico en el tejido sujeto a estrés térmico (Fig.8.5 y Cuadro 8.3). Los resultados concuerdan con lo reportado por Tawfik et al. (1996) sobre el daño a membrana inducido por calor y el efecto benéfico del calcio en plantas de papa, donde el tejido de hojas de papa Russet Burbank tratadas con calcio y nitrógeno exhibieron mayor estabilidad de membrana que los controles. Se ha sugerido que el calcio se une a fosfolípidos provocando un decremento en el área polar y posiblemente causando deshidratación parcial y neutralización de cargas; el calcio a su vez puede servir como puente para otras uniones. A concentraciones bajas de calcio, este no ocupa todos los sitios de unión, incrementándose la permeabilidad selectiva; a concentraciones elevadas (10 mM) se observa un incremento en el goteo iónico debido posiblemente a que el calcio ocupa todos los sitios de unión disponibles y provoca un empaquetamiento defectuoso de lípidos en la membrana (Smaal et al., 1987).

La adición de calcio al medio de incubación del tejido no permitió establecer inequívocamente un efecto de protección de la respiración como consecuencia de la

estabilización de la membrana por este catión. El tejido incubado con calcio mostró que la actividad reductora de las DHs endógenas se inhibe a temperatura ambiente aunque con mayor intensidad en el tejido de LT-7 (Fig.8.6 y Cuadro 8.4). La inhibición de la reducción del TTC provocada por el estrés térmico tampoco se alteró con la presencia de calcio, a excepción del tejido de Atlantic, que recuperó el 100 % de la actividad a 35°C (Fig. 8.7). La respuesta fue diferente cuando se usó tejido de tubérculos frescos sujetos a estrés, en cuyo caso el calcio sí protegió la respiración de los tres clones, sobre todo en Atlantic (Cuadro 8.4). Sin embargo, el efecto benéfico del calcio sobre la respiración no fue tan grande como el que se observó sobre la permeabilidad de membrana. Esto indica nuevamente que la actividad de las DHs de tejido bajo estrés térmico sufren un daño adicional al provocado por la simple pérdida de la compartimentalización celular de metabolitos como lo muestra la magnitud del goteo iónico.

Estudios previos han reportado el efecto de varios alcaloides de *Solanum* sobre las propiedades de membrana de sistemas tales como liposomas (Roddick y Rijnenberg, 1986), embriones de rana (Blankemeyer et al., 1992; Friedman et al., 1997) y vacuolas (Spessard et al., 1997). Los resultados indican que el potencial tóxico de los GAs reside en la capacidad de estos compuestos para unirse a las membranas y su posterior destrucción (Roddick y Rijnenberg, 1986; Roddick et al., 1990; Friedman et al., 1992; Keukens et al., 1995 y Friedman y McDonald, 1997); sin embargo, no se han realizado estudios sobre el efecto de los alcaloides sobre las membranas de las células que acumulan estos compuestos. Las curvas de dosis-respuesta obtenidas a temperatura ambiente indicaron que la adición de alcaloides (25 μ M) inhibió la respiración del tejido de Atlantic en 50%; en cambio, en el tejido de LT-7 y DTO-33 dicha adición tuvo poco efecto. 25 μ M es la concentración reportada como nivel fisiológico en los tubérculos y coincidentemente

corresponde a la Km reportada para la solanidin glucosil transferasa de estos alcaloides (Stapleton et al., 1991). El efecto que tiene la adición de alcaloides a 25 μM en el tejido no cambió significativamente a 50 μM , por lo que se decidió utilizar la última concentración. Esto indica que los alcaloides tienen la capacidad de inhibir la respiración de las células del tubérculo; sin embargo, la susceptibilidad parece tener un fuerte componente genético.

La adición de alcaloides 50 μM al medio de incubación del tejido a temperaturas supraóptimas incrementó el efecto inhibitorio de los alcaloides sobre la actividad deshidrogenasa en DTO-33 y Atlantic, indicando un efecto sinérgico entre temperatura y alcaloides. Sin embargo, la adición de alcaloides en LT-7 no causó cambios significativos (Fig. 8.9). El efecto que podría atribuirse de la temperatura sobre la actividad de alcaloides en la actividad reductora de TTC no puede establecerse inequívocamente en este experimento. Por otra parte, la adición de alcaloides a tejido fresco sujeto a estrés no afectó significativamente la actividad deshidrogenasa, a excepción del tejido de LT-7, caso en el que se recuperó significativamente dicha actividad (Cuadro 8.4). Los datos sugieren que la actividad de los alcaloides depende del estadio fisiológico del tubérculo, ya que tubérculos de diferentes edades mostraron diferente susceptibilidad a éstos.

La adición de alcaloides en tejido de tubérculos frescos, más que daño sobre la permeabilidad de membrana, sorpresivamente resultó en una tendencia a disminuir el goteo iónico de tal forma que el efecto protector del calcio parecería reforzarse por la presencia de alcaloides sobre todo en el tejido sujeto a estrés térmico (Cuadro 8.3).

La falta de reproducibilidad de la respuesta del tejido de tubérculo a la adición de alcaloides y calcio condujo a realizar un análisis de los cambios de permeabilidad de membrana durante diferentes periodos de almacenamiento del tubérculo (Cuadro 8.5). Los resultados mostraron que el goteo iónico se incrementó con el tiempo de almacenamiento del

tubérculo. Lo anterior concuerda con lo reportado por Geuns et al. (1997) quienes demostraron que el envejecimiento celular está caracterizado por un incremento en la permeabilidad de membrana, muy probablemente debido al incremento de la proporción estigmasterol/sitosterol en la membrana.

Como en los experimentos anteriores, el estrés térmico incrementó el goteo iónico pero el tejido joven fue más tolerante independientemente del clón. La adición de calcio disminuyó el goteo iónico en todos los casos, el porcentaje de recuperación fue proporcional al daño de la membrana, pero su eficiencia disminuyó en el tejido que alcanzó un goteo iónico cercano al 100%. A pesar de ello, Atlantic sigue siendo el clón que mejor responde a la adición de calcio. A temperatura ambiente, el tejido con goteo iónico elevado fue más susceptible a la acción de los alcaloides, mientras que el tejido con goteo iónico bajo (tejido joven) resultó en una tendencia a disminuirlo, no obstante DTO-33 fue menos susceptible al efecto de los alcaloides. A temperatura ambiente la presencia de calcio atenuó el efecto dañino de los alcaloides; sin embargo, en ningún caso el calcio fue capaz de contrarrestar al 100% el efecto de los alcaloides. Esto sugiere una competencia entre calcio y alcaloides por los sitios de unión en la membrana. Los resultados anteriores concuerdan con los reportados por Merrill et al. (1987) y Toyoda et al. (1991), quienes reportaron que hay una competencia entre alcaloides y calcio por la unión a la membrana de células de intestino de conejo y de rata, respectivamente. A 35°C la adición de alcaloides no afectó significativamente el goteo iónico, pero se observó una tendencia a disminuir el mismo sobre todo en el tejido de DTO-33, de tal forma que cuando el tejido se incubó simultáneamente con calcio y alcaloides a temperaturas supraóptimas la permeabilidad de membrana fue menor que en el tejido incubado solamente con calcio (Cuadro 8.5). Lo anterior sugiere que los alcaloides juegan un papel en la regulación de la

permeabilidad de membrana; sin embargo su efecto depende de los cambios en la composición química de la membrana y del clón. En tejido joven los alcaloides no afectaron la permeabilidad de membrana significativamente, pero a medida que envejece el tejido se hace más susceptible a éstos. Por otra parte, cuando el tejido se somete a temperatura supraóptima los alcaloides no dañan la permeabilidad sino que disminuyen el goteo iónico, principalmente en DTO-33. Esto apoya la hipótesis de (Bergenstrahle et al., 1992) quienes sugieren que el daño mecánico incrementa la síntesis de esteroides de membrana necesarios para la reparación del daño. La concentración de alcaloides totales disminuyó con el tiempo de almacenamiento en DTO-33 y Atlantic. Bajo las mismas condiciones experimentales, la α -chaconina que es el alcaloide más tóxico disminuyó en Atlantic; en cambio, en LT-7 y DTO-33 se incrementó. En tejido de tubérculo sujeto a estrés térmico los GAs totales disminuyeron solamente en DTO-33, mientras que en Atlantic y LT-7 no se observaron cambios significativos (Fig. 8.10); la chaconina disminuyó en DTO-33; en cambio en Atlantic aumentó (Fig.8.10). Puesto que la α -chaconina se ha identificado como la más efectiva de los tres alcaloides en la destrucción de la membrana (Roddick y Rijnenberg, 1986; Blankemeyer et al., 1992), se puede especular que la alta resistencia al calor puede involucrar una gran eficiencia de la hidrólisis de los alcaloides, particularmente de α -chaconina. Al respecto, Friedman y McDonald (1997) reportaron que las plantas pueden protegerse de una destrucción celular convirtiendo la chaconina a su forma no lítica β_2 -chaconina. Percival et al. (1993) encontraron que tubérculos de cv. Kerr's Pink almacenados a 24°C acumularon altas concentraciones de GAs totales respecto a tubérculos almacenados a 5°C. En otro estudio, rebanadas de papa de cv. Russet Burbank mostraron incremento en la concentración tanto de solanina como de chaconina en 7 h de incubación a 5 y 25°C (Maga, 1981). En

contraste, Linnemann et al. (1985) reportaron reducción en el contenido de TGA en cv. Bintje después de 12 semanas de almacenamiento a 7, 16 y 28°C. Estas evidencias y los resultados reportados en el presente trabajo sugieren que el cultivar, el estadio de desarrollo y la temperatura de almacenamiento, pueden afectar la concentración de alcaloides en tubérculos de papa. De igual manera, Zhang et al. (1997) mostraron que el genotipo, el ambiente de crecimiento y el tiempo de almacenamiento, son factores decisivos en la determinación de los TGA en los tubérculos.

El efecto del calor y los alcaloides sobre la permeabilidad de membrana y la actividad deshidrogenasa no se relacionan de una manera simple. Los datos indican que en Atlantic hubo un incremento en el potencial tóxico de los GAs a altas temperaturas y que el goteo iónico inducido por calor fue más severo que la inhibición en la capacidad reductora del TTC; el calcio claramente tuvo un efecto benéfico en ambos casos y el tratamiento con alcaloides exógenos agravó el efecto del calor. Estas observaciones apoyan la idea generalmente aceptada de que los glicoalcaloides son bioactivos por su capacidad de unirse a membrana (Roddick et al., 1992; Spessard et al., 1994). En contraste, el potencial tóxico de alcaloides en tubérculos de LT-7 no cambió significativamente a altas temperaturas y el decremento en la capacidad reductora del tejido inducido por calor fue más severo que el concomitante incremento en la permeabilidad de membrana. Además, el calcio ayudó poco en la prevención de su efecto en este caso. Los alcaloides exógenos causaron menos daño por sí mismos y no se observó el efecto sinérgico con el calor en este clón. El contenido de alcaloides totales en tubérculos de DTO-33 decreció con el tiempo de almacenamiento y bajo estrés, en cambio la respiración y la permeabilidad de membrana fueron menos afectadas. Estos resultados sugieren una termoestabilidad aparentemente más alta en DTO-33 que en Atlantic, lo cual podría estar relacionado con una mayor eficiencia de DTO-33

para la degradación de alcaloides.

En vista del severo decremento en la reducción de TTC inducido por calor, particularmente en tubérculos de LT-7 y su gran termoestabilidad de membrana, es claro que ocurren alteraciones metabólicas independientemente a las manifestadas a nivel de membrana celular. Después de 4h a 30°C, por ejemplo, el goteo iónico en LT-7 no excedió al 12%, en cambio la reducción de TTC disminuyó cerca del 50% indicando un fuerte impacto sobre la utilización de carbohidratos para la producción de energía. Esto da lugar a la pregunta de si en adición a los efectos citados sobre la termoestabilidad de la membrana, los glicoalcaloides pudieran también afectar el tamaño de las reservas de hexosa, sacarosa, almidón y NADP en tejido de tubérculo. Así, puede ser interesante estudiar el efecto de la hidrólisis de los glicoalcaloides inducidos por calor (como en el caso de DTO-33) o la síntesis (como el caso de Atlantic) sobre el metabolismo de carbohidratos en el tejido de tubérculo.

El análisis de los niveles endógenos de Pi en el tejido de los tres clones mostró que la concentración se incrementó en el tejido de Atlantic y DTO-33 con el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, siendo mayores en DTO-33, sin cambios significativos en LT-7 (Fig. 8.11). Una posible explicación a la variación en el contenido de Pi entre clones podría ser que la concentración de éste sea determinada genéticamente. De igual manera se ha establecido para el calcio endógeno en tubérculos ya que los niveles de calcio endógeno son dependientes del clón y las progenies resultantes de las cruzas entre clones de alta y baja concentración mostraron claramente un cambio significativo en la acumulación de éste (Bamberg et al. 1998). Además, esto podría explicar en parte las diferencias encontradas en la acumulación de almidón entre clones recién cosechados (Fig. 8.12). En este sentido, se observó una correlación inversa entre el contenido de Pi y la

concentración de almidón. La concentración más elevada de Pi se observó en DTO-33, que es el clón con menor contenido de almidón. Atlantic presentó la concentración de Pi más baja y los niveles más elevados de almidón. LT-7 mostró niveles intermedios de Pi y almidón. Este resultado no concuerda con estudios previos que muestran que el contenido de Pi no afecta significativamente la concentración de almidón como lo sugieren Cottrell et al. (1995). Aunque no sabemos la localización del Pi, se ha demostrado que niveles elevados de Pi favorecen la inhibición de la síntesis del almidón a nivel de la AGPP (Sowoquinos, 1981) y de la almidón sintetasa, además de activar su degradación a nivel de la almidón fosforilasa (Sowoquinos et al., 1985). La regulación de la acumulación de almidón y azúcares libres en tubérculos de papa no ha sido elucidada completamente. La actividad de las enzimas involucradas no siempre correlaciona con la concentración de almidón y azúcares. Por ejemplo, la inhibición de la ADP-glucosa pirofosforilasa en hojas de plantas transgénicas de papa incrementó el transporte de sacarosa al tubérculo; no obstante, la acumulación de almidón en dicho órgano no se alteró (Leidreiter et al., 1995). Por otra parte, plantas sujetas a déficit de agua incrementaron la concentración de ADP-glucosa, pero la síntesis de almidón mostró una fuerte inhibición (Geigemberger et al., 1997). Lo anterior indica que si bien es cierto que la fuente de carbono (sacarosa), así como el sustrato (ADP-glucosa) de la almidón sintetasa son indispensables para la síntesis de almidón, su presencia no determina los niveles de almidón en el tubérculo.

El estrés térmico incrementó la concentración de Pi independientemente del clón que se tratara; sin embargo, el tejido más joven mostró mayor incremento en los niveles de Pi en respuesta al estrés. LT-7 fue el que tuvo mayor porcentaje de incremento, alcanzado niveles similares a los de DTO-33. La concentración de Pi varió entre 4 y 10 $\mu\text{M/g}$ tejido fresco, lo cual coincide con lo reportado por Bielecki (1973).

De igual forma se encontró una relación inversa entre la concentración de GAs totales y contenido en almidón a temperatura ambiente en tejido incubado a temperatura ambiente (Fig. 8.12). El tejido de DTO-33 acumuló la concentración más alta de GAs totales y los niveles más bajos de almidón, en cambio Atlantic mostró los niveles más bajos de alcaloides y la concentración más alta de almidón. Estos resultados sugieren que elevadas concentraciones de alcaloides podrían propiciar cambios en la permeabilidad de membrana con la concomitante alteración en la compartimentalización celular del Pi y una subsecuente degradación del almidón. Para probar dicha hipótesis, se montó la técnica para aislar protoplastos y amiloplastos de tejido de tubérculo y en un futuro cercano se pretende adicionarles exógenamente Pi y alcaloides para ver si se induce la degradación de almidón. El contenido de alcaloides totales disminuyó en el tejido de tubérculos sujetos a estrés durante 24h (Fig. 8.11) independientemente del clón que se tratara. En cambio, la concentración de estos no cambió significativamente en las primeras 4h de incubación bajo la mismas condiciones, excepto en el tejido de DTO-33, en cuyo caso disminuyó (Fig. 8.10). Lo anterior indica que es diferente la velocidad de la activación de la glicosidasa de estos alcaloides, pues anteriormente se reportó que esta enzima se activa significativamente entre 30 y 50°C, con una temperatura óptima de 42°C (Bushway et al., 1998). Por otra parte, la α -chaconina disminuyó en las primeras 4h de incubación en el tejido de DTO-33, mientras que en el tejido de Atlantic y LT-7 se incrementó; sin embargo, cuando el tiempo de estrés se mantuvo durante 24h, invariablemente disminuyó. Al respecto, Moehs et al. (1977) reportaron que la transcripción de la SGT es transitoria. Es de conocimiento general que la concentración de cualquier metabolito está determinado por los niveles de síntesis y degradación. Como objetivo adicional de este trabajo se montó la metodología para determinar los niveles y tiempos de transcripción (Northern) de la SGT y Western blot para

determinar la concentración de los tres glicoalcaloides.

La concentración de azúcares libres y almidón no cambió significativamente en el tejido incubado a 35°C durante 4h, a excepción de la glucosa, por lo que se decidió incubar el tejido a la misma temperatura pero por un periodo de tiempo más prolongado. La incubación del tejido durante 24h a 35°C provocó un decremento en la concentración de azúcares libres totales en DTO-33 y en menor grado en Atlantic, en cambio en LT-7 aumentó ligeramente; esto coincide con la capacidad reductora del tejido, indicando la utilización de los azúcares en la respiración en el caso de Atlantic y DTO-33, no así para LT-7, que fue el clón que mostró mayor inhibición de las DHs endógenas bajo estrés térmico.

En resumen, las alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares y en la respiración inducidas por calor, son mediadas por concentraciones elevadas de alcaloides, que a su vez, propician la descompartmentalización del Pi; esto a su vez, favorece la degradación de almidón. La inhibición severa de la respiración provoca la acumulación de azúcares libres en el citoplasma, que de otro modo serían utilizados en la vía respiratoria para lograr el aporte energético adicional a expensas del almidón. La tolerancia del tejido de tubérculo al calor involucra su capacidad para mantener la estabilidad de membranas y respiración, así como la capacidad para degradar alcaloides.

CONCLUSIONES

- La concentración de alcaloides, Pi y almidón son dependientes del genotipo
- Los clones tolerantes a calor se caracterizaron por la capacidad del tejido de tubérculo para mantener estable la permeabilidad de membrana y la respiración.
- La alteración de la permeabilidad de la membrana como resultado del estrés térmico no explica la inhibición de la respiración.
- Bajas concentraciones endógenas de alcaloides propician mayor termoestabilidad de la membrana y la respiración.
- La adición de alcaloides al medio de incubación a temperatura ambiente tuvo un efecto similar al provocado por estrés térmico.
- La adición de calcio protege la permeabilidad de membrana y en menor grado la respiración bajo estrés térmico.
- La adición de calcio modifica el efecto de los alcaloides exógenos.
- Baja concentración de Pi permite mayor acumulación de almidón.
- Altas concentraciones de alcaloides favorecen la descompartamentación celular del Pi propiciando la degradación de almidón.
- La inhibición severa de la respiración provoca la acumulación de azúcares libres en el citoplasma.

X. BIBLIOGRAFIA

- Allen, E. and Kuc, J. (1968). α -Solanine and α -chaconine as fungitoxic compounds in extracts of Irish potato tubers. *Phytopath.* 58: 776-781.
- Bamberg, J.B.; Palta, L.A.; Martin, M. And Krueger, A.R. (1998). Fine screening Potato (*Solanum*) species germoplasm for tuber calcium. *Am. J. Potato Res.* 75: 181-186.
- Bergenstrahle, A; Borga, P. And Jonsson, L.M. (1996). Sterol composition and synthesis in potato tuber discs in relation to glycoalkaloid synthesis. *Phytochem.* 41: 155-161.
- Blankemeyer, T.J.; Stringer, K.B.; Rayburn, R.J.; Bantle, A.J. and Friedman, F.M. (1992). Effect of potato glycoalkaloids, α -chaconine and α -solanine on membrane potencial of frog embryos. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2022-2025.
- Burden, S.R.; Cooke, T.D. and Carter, A.G. (1989). Inhibitors of esterol biosynthesis and growth in plants and fungi. *Phytochem.* 28: 1791-1804.
- Bushway, R.J., Bureau, J.L. and Stickney, M.R. (1985). A new efficient method for extracting glycoalkaloids from dehydrated potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 33: 45-46.
- Bushway, A.A.; Bushway, R.J. and Kim C.H. (1988). Insolation, partial purification and characterization of a potato peel glycoalkaloid glycosidase. *Am. Potato J.* 65: 621-631.
- Caldwell, K.A.; Grosgean, O.K.; Henika, P.R. and Friedman, M (1991). Hepatic ornithine decarboxilase induction by potato glyalkaloids in rats. *Food Chem. Toxicol.* 29: 531-535.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* 162: 156-159.

- Coria, N.A.; Sarquís, J.I.; Peñalosa, I. and Urzúa M. (1998). Heat-induced damage in potato (*Solanum tuberosum*) tubers: membrane stability, tissue viability, and accumulation of glycoalkaloids. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4524-4528.
- Coxon, D.T. (1984). Methodology for glycoalkaloid analysis. *Am. Potato J.* 61: 169-183.
- Crafts-Brandner, S.J. and Salvucci, M.E. (1989). Species and environmental variations in the effect of inorganic phosphate on sucrose-phosphate synthase activity. *Plant Physiol.* 91: 469-472.
- Currier, W.W. and Kuc, J. (1975). Effect of temperature on Rishitin and steroid glycoalkaloid accumulation in potato tubers. *Phytopath.* 65: 1195-1197.
- Deahl, K.L.; Cantelo, W.W.; Sinden, S.L. and Sanford, L.L. (1991). The effect of light intensity on colorado potato beetle resistance and foliar glycoalkaloid concentration of four *Solanum chacoense* clones. *Am. Potato J.* 68: 659-666.
- Doehlert, D.C. and Huber, S.C. (1983). Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiol.* 73: 989-994.
- Edwards, E.J. and Cobb, A.H. (1997). Effect of temperature on glycoalkaloid and chlorophyll accumulation in potatoes (*Solanum tuberosum* L. Cv. King Edward) stored at low photon flux density, including preliminary modeling using an artificial neural network. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1032-1038.
- Ewing, E.E. (1981). Heat stress and tuberization stimulus. *Am. Potato J.* 58: 31-49.
- Fewell, M.A. and Roddick, G.J. (1993). Interactive antifungal activity of the Glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine. *Phytochem.* 33: 223-328.
- Fisher, L. (1980). Gel filtration chromatography. In: *Laboratory Technique biochemistry & Molecular Biology*. T.S. Work & H. Burdon eds. Elsevier /North-Holand. Amsterdam.

pp 191-204.

- Fitzpatrick, T.J.; Herb, S.F.; Osman, S.F. and McDermott J.A. (1977). Potato glycoalkaloids: increases and variations of rations in aged slices over prolonged storage. *Am. Potato J.*54: 539-545.
- Fitzpatrick, T.J.; Mackenzie, J.D. and Gregory, P. (1978). Modifications of the comprehensive method for total glycoalkaloid determination. *Am. Potato J.* 55: 247-248.
- Friedman, G.J.; Rijnenberg, L.A. and Weissenberg, M. (1990). Membrane-disrupting properties of the steroidal glycoalkaloids solasonine and solamargine. *Phytochem.* 29: 1513-1518.
- Friedman, M. (1992). Composition and safety evaluation of potato berries, potato and tomato seeds, potatoes, and potato alkaloids. In: *Assessment of food safety*. Finley, J.W. and Armstrong, A., Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., ACS Symposium Series 484: 429-462.
- Friedman, M. and Henika, P.R. (1992). Absence of genotoxicity of potato alkaloids α -solanine and solanidine in the Ames *Salmonella* an adult and foetal erythrocyte micronucleus assay. *Food Chem. Toxicol.* 30: 689-694.
- Friedman, M. and Dao, L. (1992). Distribution of glycoalkaloids in potato plants and comercial potato products. *J. Agric. Food Chem.* 40: 419-423.
- Friedman, M., Rayburn, R.J. and Bantle, A.J. (1992). Structural relationships and developmental toxicity of *Solanum* alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* *J. Agric. and Food Chem.* 40: 1617-1624.
- Friedman, M.; Henika, R.P. and Mackey, E.B. (1996). Feeding of potato, tomato and eggplant alkaloids affects food consumption and body and liver weights in mice. *J. Nutr.*126: 989-999.

- Friedman, M. and McDonald, G.M. (1997). Potato Glycoalkaloids: Chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Critical Rev in Plant Sci.* 16: 55-132.
- Geigenberger, P.; Reimholz, R.; Geiger, M.; Merlo, L.; Canale, V. And Stitt, M. (1997). Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta.* 201: 512-518.
- Geuns, J.M.; Van Loenhout, H.E.; Valcke, R.L.; Van Loven, K.; Redig, P.; Veselov, S.Y.; Kudoyarova, G.R.; Van Onckelen, H.A. and Vendrig, J.C. (1997). Sterols and polyamines in IPT-transformed tobacco plants. *Phytochem.* 44: 797-804.
- Gregory, P. (1984). Glycoalkaloid composition of potatoes: diversity and biological implications. *Am. Potato J.* 61: 115-122.
- Heftmann, E. (1983) Biogenesis of steroids in Solanaceae. *Phytochem.* 22: 1843-1860.
- Hwei-Hwang, C.; Zheng-Yan, S. and Li, P. H. (1982). Adaptability of crop plants to high-temperature stress. *Crop. Sci.* 22: 719-724.
- Jadhav, S.J. and Salunkhe, D.K. (1975). Formation and control of chlorophyll and glycoalkaloids in tubers of *Solanum tuberosum* L. potatoes and evaluation of glycoalkaloid toxicity. *Adv Food Res.* 21: 307-354.
- Jenifer, A. (1987). Glycoalkaloids, proteinase inhibitors and lectins. *Wolfe Potato, In Human Nutrition.* International Potato Center & Academic Press. pp 162-190.
- Jonasson, T. and Olsson, K. (1994). The influence of glycoalkaloids, chlorogenic acid and sugars on the susceptibility of potato tubers to wireworm. *Potato Res.* 37: 205-216.
- Kadian, M.S.; Thakur, K.C. and Upadhyia, M.D. (1996). True potato seed utilization and transfer of technology in south and west Asia. In: *Production and utilization of potato seed in Asia.* M.D. Upadhyia; B. Hardhy; P.C. Gaur and S.G. Ilangantileke, Eds; CIP, Icar, New Dehli, India. pp 77-83.

- Keukens**, J.E.; Vrije, T; van den Boon, C.; Waard, P.; Plasman, H.H; Thiel F; Chupin, V.; Jongen, F.W. and Kruijff, B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloids induced membrane disruption. *Biochem. et Biophys. Acta* 1240: 216-228.
- King**, A.I., Reid, M.S, and Patterson, B.D. (1982). Diurnal changes in the chilling sensitivity of seedlings. *Plant Physiol.* 70: 211-214.
- Krauss**, A. and Marschner, H. (1984). Growth rate and carbohydrate metabolism of potato tubers exposed to high temperatures. *Potato Res.* 27: 297-303.
- Kuc**, J. (1975). Teratogenic constituents of potato. *Recent Adv. Phytochem.* 9: 139-150
- Lafta**, A.B. and Lorenzen, J.H. (1995). Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiol.* 109: 637-643.
- Leidreiter**, K.; Heineke, D.; Heldt, H.; Müller, B.; Sonnewald, U. and Willmitzer, L. (1995). Leaf-specific antisense inhibition of starch biosynthesis in transgenic potato plants leads to an increase in photoassimilate export from source leaves during the light period. *Plant Cell Physiol.* 36: 615-624.
- Linnemann**, R.A.; Van Es, A. and Hartmans, J.K. (1985). Changes in the content of L-ascorbic acid, glucose, fructose, sucrose and total glycoalkaloids in potato (cv. Binje) stored at 7, 16 and 28°C. *Potato Res.* 28: 271-278.
- Mackenzie**, J.D. and Gregory, P. (1979). Evaluation of a comprehensive method for total glycoalkaloid determination. *Am. Potato J.* 56: 27-33.
- **Maga**, J. (1980). Potato glycoalkaloids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12: 317-405.
- Maga**, A. J. (1981). Total and individual glycoalkaloid composition of stored potato slices. *J. Food Process. and Preserv.* 5: 23-29.
- Maine**, J.M.; Bain, H. and Joyce, L.A. (1988). Changes in the total tuber glycoalkaloid content of potato cultivars on exposure to light. *J. Agric. Sci., Camb.* 111:57-58.

- Merlo, L.; Geigenberger, P.; Mohamed, H; and Stitt, M. (1993). Changes of carbohydrates, metabolites and enzyme activities in potato tubers during development, and within a single tuber a stolon-apex gradient. *J. Plant Physiol.* 142: 392-402.
- Merrill, A.R.; Aubry, H.; Proulx, P. and Szabo, A.G. (1992). Relation between Ca^{+2} uptake and fluidity of brush-border membranes isolated from rabbit small intestine and incubated with fatty acids and methyl oleate. *Biochemica et Biophysica Acta.* 896: 89-95.
- Moehs, C.P.; Allen, P.V.; Friedman, M. And Belknap, W.R. (1997). Cloning and expression of Solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *The Plant J.* 11:: 227-236.
- Mohabir, G. and John, P. (1988). Effect of temperature on starch synthesis in potato tuber tissue and in amyloplasts. *Plant Physiol.* 88: 1222-1228.
- Mondy, N.I. and Chandra, S. (1979). Reduction of glycoalkaloid synthesis in potato slices water soaking. *Hort. Sci.* 14: 173-174.
- Nes, W.D.; Hanners, K.H.; Bean, A.G. and Patterson, W.G. (1982). Inhibition of growth and sitosterol-induced sexual reproduction in *Phytophthora cactarum* by steroidal alkaloids. *Physiol. and Biochem.* 72. 447-450.
- Rayburn, R.J.; Bantle, A.J. and Friedman, M. (1994). Role of carbohydrate side chains of glycoalkaloids in developmental toxicity. *J. Agric. and Food Chem.* 42: 1511-1515.
- Rayburn, R.J.; Friedman, M. and Bantle, A.J. (1995). Synergistic interaction of glykoalcaloids α -chaconine and α -solanine on developmental toxicity in *Xenopus* embryos. *Fd. Chem. Tox.* 33: 1013-1019.
- Richardson, D.L.; Davies, H.V.; Ross, H.A. and Mackay, G.R. (1990). Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. *J. Experimental. Botany.* 41: 95-

- Roddick**, G.J. and **Drysdale**, R.B. (1984). Destabilization of liposome membranes by the steroidal glycoalkaloid α -tomatine. *Phytochem.* 23: 543-547.
- Roddick**, G.J. and **Rijnenberg**, L.A. (1986). Effect of steroidal glycoalkaloids of potato on the permeability of liposome membranes. *Physiol. Plantarum* 68: 436-440.
- Roddick**, G.J. (1989). The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *Phytochem.* 28: 2631-2634.
- Roddick**, G.J.; **Rijnenberg**, L.A. and **Weissenberg**, M. (1990). Membrane-disrupting properties of the steroidal glycoalkaloids solasonine and solamargine. *Phytochem.* 29: 1513-1518.
- Roddick**, G.J.; **Rijnenberg**, L.A. and **Weissenberg**, M. (1992). Alterations to the permeability of liposome membranes by the solasodine-based glycoalkaloids solasonine and solamargine. *Phytochem.* 31: 1951-1954.
- Salunkhe**, D.K.; **Wu**, M.T. and **Jadhav**, S.J. (1972). Effects of light and temperature on formation of solanine in potato slices. *J. Food Sci.* 37: 969-970.
- Sanford**, L.L.; **Deahl**, L.K.; **Sinden**, L.S. and **Ladd**, L.T. (1990). Foliar solanidine glycoside levels in *Solanum tuberosum* populations selected for potato leafhopper resistance. *Am Potato J.* 67: 461-466.
- Sarquís**, J.I.; **González**, H. and **Bernal**, I. (1996). Response of two potato clones two contrasting temperature regimes under field conditions. *Am. Pot. J.* 73: 285-300.
- Sarquís**, J.I.; **Aguilar**, I.; **Coria**, N.A. and **Rivera**, A. (1999). Glycoalkaloid content in *Solanum* species and hybrids from a breeding program for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). *J. Agric. Food Chem*
- Shih**, M. and **Kuc**, J. (1973). Incorporation of ^{14}C from acetate and mevalonate into Rishitin and steroid glycoalkaloids by potato tubers slices inoculated with *Phytophthora*

infestans. *Phytopath.* 63: 826-829.

-Shih, M. and Kuc, J. (1974). α and β -solanigrine in Kennebec *Solanum tuberosum* leaves and aged tuber slices. *Phytochem.* 13: 997-1000.

-Smaal, E.B.; Mandersloot, J.G.; Demel, R.A.; de Krijff B. and de Gier J. (1987). Consequences of the interaction of calcium with Dioleoylphosphate-containing model membranes: calcium-membrane and membrane interactions. *BBA. Elsevier.* 897: 180-190.

-Sinden, S.L. and Webb, R.E. (1972). Effect of variety and location on glycoalkaloid content of potato. *Am. Potato J.* 49: 334-338.

-Sinden, S.L.; Sanford, L.L. and Webb, R.E. (1984). Genetic and environmental control of potato glycoalkaloids. *Am. Potato J.* 61: 141-156.

-Sinden, S.L.; Cantelo, W.W.; Sanford, L.L. and Deahl, K.L. (1991). Allelochemically mediated host resistance to the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (say) (coleoptera: Chrysomelidae). *Mem. Ent. Soc. Can.* 157: 19-28.

-Sowokinos, J.R. (1981). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. II. Catalytic properties and regulation of ADP-glucose and UDP-glucose pyrophosphorylase activities in potatoes. *Plant Physiol.* 68: 924-929.

-Sowokinos, J.R.; Lulai, E.C. and Knoper, J.A. (1985). Translucent Tissue defects in *Solanum tuberosum* L. I. Alterations in amyloplast membrane integrity, enzyme activities, sugars, and starch content. *Plant Physiol.* 78: 489-494.

-Sowokinos, J. (1990). Stress-induced alterations in carbohydrate metabolism. In: *The Molecular & Cellular Biology of Potatoes. Biotechnology in Agriculture No. 3.* Vayda, M.E. and Park, W.D. eds. Cab. pp137-158.

-Stapleton, A.; Allen, P.V.; Friedman, M. and Belknap, W.R. (1991). Purification and characterization of solanidine glucosyltransferase from the potato (*Solanum tuberosum*). *J*

Agric. and food Chem. 39: 1197-1203.

-Sun, J.; Loboda, T.; Sung, S-J. and Black, C. (1992). Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol.* 98: 1163-1169.

-Tawfik, A.A.; Kleinhenz, M.D. and Palta, J.P. (1996). Application of calcium and nitrogen for mitigation heat stress effects on potatoes. *Am. Potato J.* 73: 261-273.

-Tingey, M.W. (1984). Glycoalkaloids as pest resistance factors. *Am Potato J.* 5: 157-167.

-Toyoda, M.R.; Rausch, W.D.; Inoue, K.O; Fujiyama, Y.T. and Saito, Y. (1991). Comparison of solanaceous glycoalkaloid-invoked Ca^{+2} influx in different types of cultured cells. *Toxicol. In Vitro.* 5: 347-351.

-Uemura, M. and Yoshida, S. (1984). Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 75: 816-826.

-van Gelder, W.M.J. (1990). Chemistry, toxicology, and occurrence of steroidal glycoalkaloids: potential contaminants of the potato (*Solanum tuberosum* L.). In: *Poisonous plants contaminating Edible plants.* Rizk, A-F. M., Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 117-156

-van Gelder, J.M. and Scheffer, J.J. (1991). Transmission of steroidal glycoalkaloids from *Solanum vernei* to the cultivated potato. *Phytochem.* 30: 165-168.

-Weiner, H., McMichael, R.W.Jr. and Huber, S. (1992). Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase in vivo. *Plant Physiol.* 99: 1435-1442.

-Weltring, K-M.; Wessels, J. and Geyer, R. (1997). Metabolism of the potato saponins α -chaconine and α -solanine by *Gybbarella pilicularis*. *Phytochem.* 46: 1005-1009.

- Woodson, W.R. and Handa, A.K. (1987). Changes in protein patterns and in vivo protein synthesis during presenesence and senescence of Hibiscus petals. *J. Plant Physiol.* 128:: 67-75
- Xu, D.; Sung, S.J.; Loboda, T.; Kormanik, P.P and Black, C.C. (1989). Characterization of sucrolysis via the uridine diphosphate and pyrophosphate-depndent sucrose synthase pathway. *Plant Physiol.* 90: 635-642.
- Zhang, L.; Porter, A.G. and Bushway, R.J. (1997). Ascorbic and glycoalkaloid content of Atlantic and Superior potato tubers as affected by supplemental irrigation and soil amendments. *Am. Potato J.* 74: 285-304.