

REVISION

# El papel del ácido jasmónico y giberelinas en la ontogenia de las plantas considerando especialmente el desarrollo de los frutos.

Wilfried Dathe

## RESUMEN

El ácido jasmónico (JA) y sus análogos despertaron el interés de los fisiólogos vegetales por su amplia presencia en el reino vegetal, como eficaces promotores de la senescencia y como factores endógenos del desarrollo de las plantas involucrados en diferentes procesos fisiológicos. Este artículo trata el probable papel que dichos compuestos juegan en diferentes estadios de la ontogenia de la planta, especialmente en la germinación y el crecimiento de la plántula, en el crecimiento y la senescencia de los órganos vegetativos así como en el desarrollo reproductivo, especialmente en los frutos. Las giberelinas (GAs) parecen estar involucradas en el proceso de regulación del cuajado de los frutos. Investigaciones en *Carica papaya* demostraron que en los frutos jóvenes en desarrollo predominan las giberelinas biológicamente muy activas GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> y en los frutos amarillos destinados a caer la GA<sub>55</sub> y un conjugado neutro de GA<sub>3</sub>. La presencia de GAs poco activas en frutos senescentes podría correlacionarse con los procesos fisiológicos conducentes a la caída.

**Palabras clave:** Jasmonic acid and analogues, cucurbitic acid and analogues, gibberellins, growth, germination, fruit development, *Triticum aestivum*, *Glycine max*.

Dathe, Wilfried, 1992. Role of jasmonic acid and gibberellins in plants ontogeny, specially in relation to fruit development. *Agriscientia* IX, N° 1 : 17-30.

## SUMMARY

Jasmonic acid (JA) and its analogues attracted the interest of plant physiologists through its widespread occurrence within the plant kingdom, as effective promoters of senescence and as endogenous factors of plant development involved in different physiological processes. This paper deals with the possible role of these compounds at different stages of plant ontogeny. The attention is directed to the germination process and growth of seedlings, to the growth and senescence of vegetative organs as well as to the reproductive stages of development, especially to fruit formation.

The gibberellins (GAs) seem to be involved in the regulation of fruit set. Investigations in *Carica papaya* showed that the very active GAs A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> were dominant in young developing fruits, while GA<sub>55</sub> and a neutral GA<sub>3</sub> conjugate were the major components in yellow fruits destined for abscission. The occurrence of low active GAs in abscising fruits seem to be connected with the physiological processes leading to the abscission.

Wilfried Dathe, Instituto de Bioquímica de las Plantas, P.O. Box 250, D-O-4010 Halle/Saale, República Federal de Alemania.

## INTRODUCCION

El ácido jasmónico (JA, Fig. 1), un nuevo regulador de crecimiento endógeno, despertó el interés de los fisiólogos vegetales al comienzo de la década del 80, después que Ueda y Kato (1980) determinaron que el éster metílico del JA (JAMe) resulta una sustancia muy eficaz en la promoción de la senescencia en hojas de *Artemisia absinthium*. Casi al mismo tiempo en nuestro laboratorio en Halle (Dathe *et al.*, 1981) aislamos el ácido libre a partir del pericarpio de *Vicia faba*, el que actuaba como un inhibidor del crecimiento. Anteriormente se había detectado el JAMe como sustancia aromática en *Jasminum grandiflorum* y *Rosmarinus officinalis* (Demole *et al.*, 1962; Crabalona, 1967) y el ácido libre en el medio de cultivo del hongo *Lasiodiplodia theobromae* (Griff. & Maubl) (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) (Aldridge *et al.*, 1971). Hoy se sabe que conjuntamente con el JA se encuentran también un compuesto isómero de JA, el ácido 7-iso-jasmónico (7-iso-JA), los ésteres metílicos de los mismos, conjugados con aminoácidos, así como análogos de JA y 7-iso-JA con modificaciones en el anillo ciclopentanona y en las cadenas laterales (ver Sembdner *et al.*, 1989, 1990; Miersch, 1991). El JA y sus análogos están presentes en todo el reino vegetal, no sólo en las plantas superiores (Meyer *et al.*, 1984;

ver Sembdner *et al.*, 1989; 1990) sino también en algunas plantas inferiores (Krupina y Dathe, 1991).

La actividad biológica de JA y sus análogos es diferente, dependientemente del proceso fisiológico influenciado. El efecto más conocido es la promoción de la senescencia, especialmente en segmentos de hoja de cebada y avena (ver Parthier, 1990). El JA está también involucrado en la respuesta de la planta al estrés y heridas (Mason y Mullet, 1990; Parthier *et al.*, en prensa; Farmer y Ryan, 1992). Por todas las propiedades de JA y sus análogos conocidos se puede suponer que el JA juega un papel importante en la regulación endógena de algunos procesos fisiológicos durante el desarrollo de las plantas.

Las giberelinas como promotores del crecimiento, son un grupo de fitohormonas tratadas en numerosos artículos y libros en cuanto a su química, bioquímica y fisiología (ver Takahashi *et al.*, 1991).

## LA GERMINACION Y EL CRECIMIENTO DE LA PLANTULA

La germinación de las semillas casi no es influida por el JA o JAMe, ya que solamente altas concentraciones son capaces de inhibir el proceso. El ácido abscísico (ABA) es siempre más eficaz que el JA o JAMe (Corbineau *et al.*, 1988; ver Sembdner *et al.*, 1989). Altas concentracio-

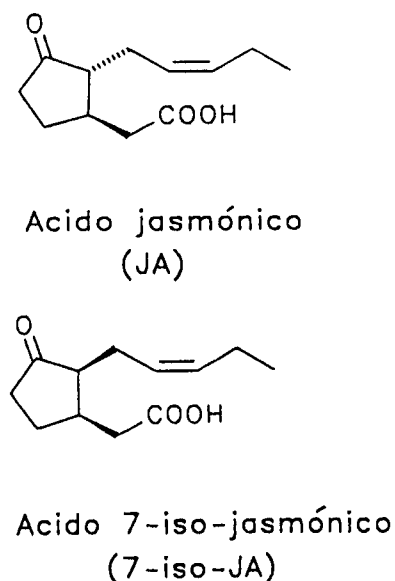


Figura 1. Estructuras de JA y 7-iso-JA

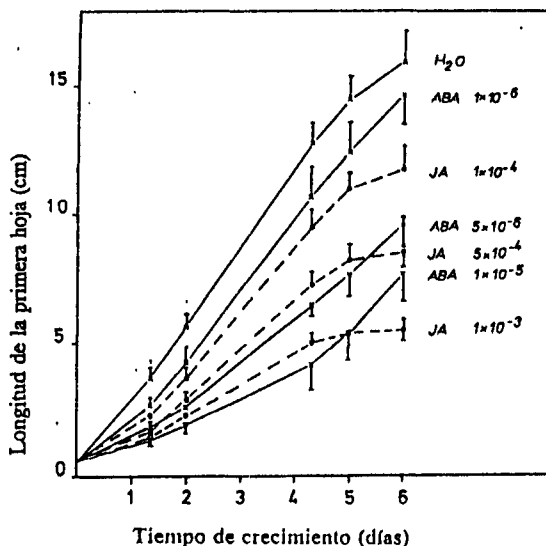
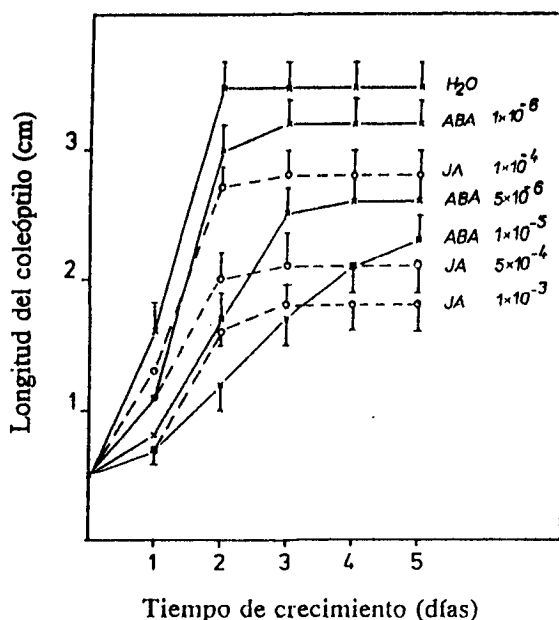


Figura 2. Crecimiento de la primera hoja de la plántula de trigo bajo la influencia de JA y ABA.



**Figura 3.** Crecimiento del coleóptilo de la plántula de trigo bajo la influencia de JA y ABA

nes de MJ y ABA disminuyen la asimilación de O<sub>2</sub> por las semillas. Por otra parte si el ambiente de las semillas está enriquecido con O<sub>2</sub> el efecto de inhibición sobre la germinación por JAME o ABA está reprimido (Corbineau *et al.*, 1988).

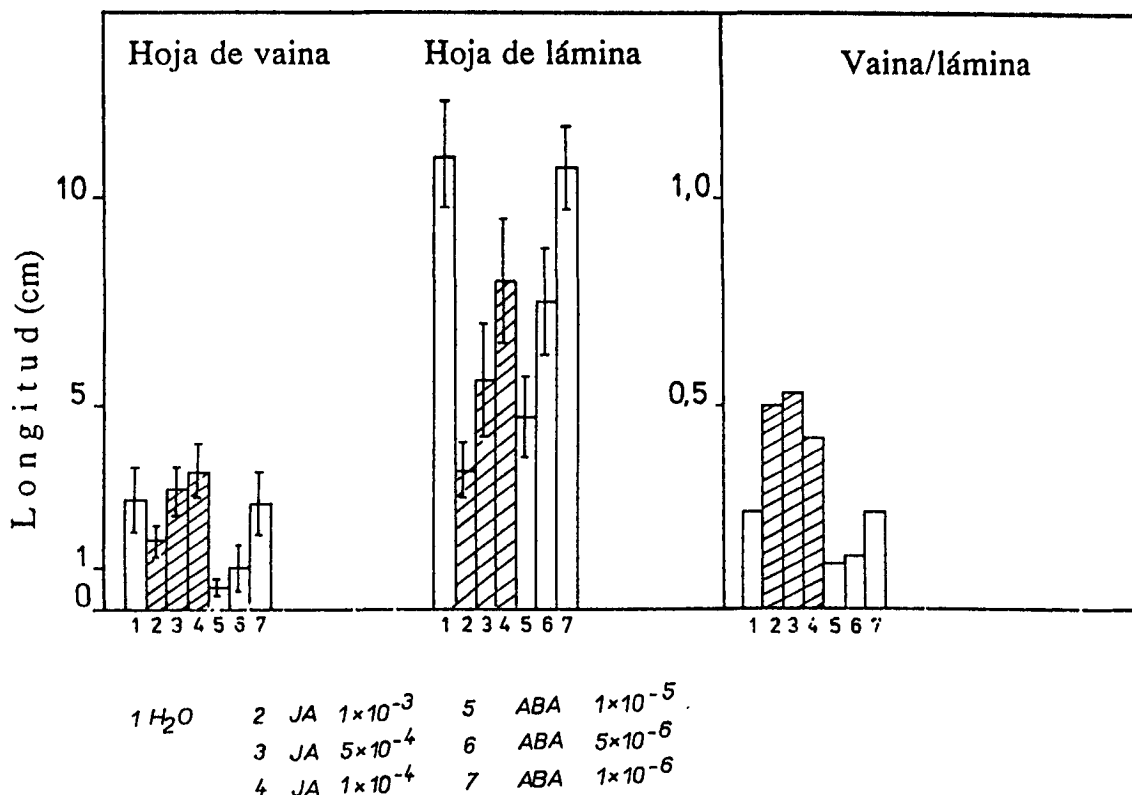
También analizamos el efecto de JA y sus análogos sobre el crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L., variedad "Hatri"), que utilizamos en el bioensayo para detectar JA en el pericarpio de *Vicia faba* (Dathe *et al.*, 1981). Detectamos grandes diferencias entre JA y ABA en el crecimiento de las plántulas (20° C, luz blanca permanente, 3000 lux, 5 plántulas en 1 ml solución -Dathe *et al.*, 1978). La curva de crecimiento de la primera hoja bajo la influencia de JA se corresponde con la curva de plántulas control en agua, solamente la altura se vió reducida (Fig. 2). Bajo la influencia de ABA el crecimiento de la primera hoja fue significativamente reducido en los primeros 3-4 días; después aumentó la tasa de crecimiento. En los coleóptilos en crecimiento se encontró la misma diferencia entre JA y ABA (Fig. 3). En la primera hoja de la plántula el JA inhibió más el crecimiento de la lámina que de la vaina y el cociente entre vaina y lámina fue superior que el control en las plántulas tratadas con JA e inferior que el control en las plántulas tratadas con

ABA (Fig. 4), lo que indica que JA y ABA tienen diferentes sitios de acción.

Mucho más sensibles que el tallo son las raíces (condiciones similares al experimento anterior, 5 plántulas en 5ml de solución; en cada planta se midieron las 3 raíces primarias y las raíces secundarias diariamente). Los dos, JAME y ABA, inhibieron el crecimiento de las raíces primarias hasta  $3 \times 10^{-6}$  M; JAME fue más eficaz que JA y ABA; concentraciones inferiores fueron menos eficaces. El JAME inhibió el crecimiento de las raíces casi completamente mientras que el ABA retardó el crecimiento de las mismas. Si se modifica la estructura de JA y reduce el grupo cetónico a un grupo hidroxilo (7-iso-JA - ácido cucúrbico (CA), Fig. 12) se pierde la actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la raíz (Fig. 5). El JAME inhibe también el crecimiento de las raíces secundarias más eficazmente que el ABA, pero el efecto de ambos compuestos es menor que en las raíces primarias (Fig. 5). Este efecto no es específico solamente para cereales; en plántulas de *Helianthus annuus* el JAME inhibe más efectivamente que el ABA el crecimiento de las raíces y la raíz reacciona mejor ante JAME que el tallo (Corbineau *et al.*, 1988).

Investigamos también la interacción entre JA y GA<sub>3</sub> en plántulas de arroz enano "Tangin bozu" por medio de la aplicación de los compuestos por vía radical (Sembdner *et al.*, 1976; Sembdner *et al.*, 1983). Las plántulas se hicieron crecer en diferentes concentraciones de JAME o análogos combinadas con GA<sub>3</sub> ( $1 \times 10^{-5}$  M). Los resultados mostraron, que el JAME (Fig. 6) y el éster metílico de CA (CAME; resultados no mostrados) fueron capaces de anular la estimulación del crecimiento por GA<sub>3</sub> si la concentración del compuesto era 10 veces más alta que la concentración de GA<sub>3</sub>. Es importante que los compuestos se apliquen antes o simultáneamente con GA<sub>3</sub>; de lo contrario la aplicación de los mismos casi no tiene efecto antagónico con GA<sub>3</sub> (Figs. 6 y 7).

Todos los efectos observados en plántulas requieren de la absorción de los compuestos por la raíz. Por ese motivo aplicamos <sup>14</sup>C-(±)-JA (5,23 μg =  $1,28 \times 10^6$  dpm, facilitado gentilmente por Dr. Knöfel - Knöfel *et al.*, 1988) combinado con (±)-JA en una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M a la raíz. En cada tubo de ensayo (0,8 ml de solución) pusimos 5 plántulas (5 mm coleóptilo), montamos 6 tubos y cultivamos en 16 h de luz (6.500 lux) y 8 h oscuridad, 20° C. Después de uno y dos días de crecimiento analizamos la distribución de la radioactividad en las raíces, el cariopse, el tejido intermedio entre raíz y tallo, el tallo, y la solución de incubación. Después de uno y dos días muy poco



**Figura 4.** Efecto de JA y ABA sobre el crecimiento de la vaina y lámina de la primera hoja de la plántula de trigo. Las plántulas crecieron durante 5 días en la solución de dichos compuestos.

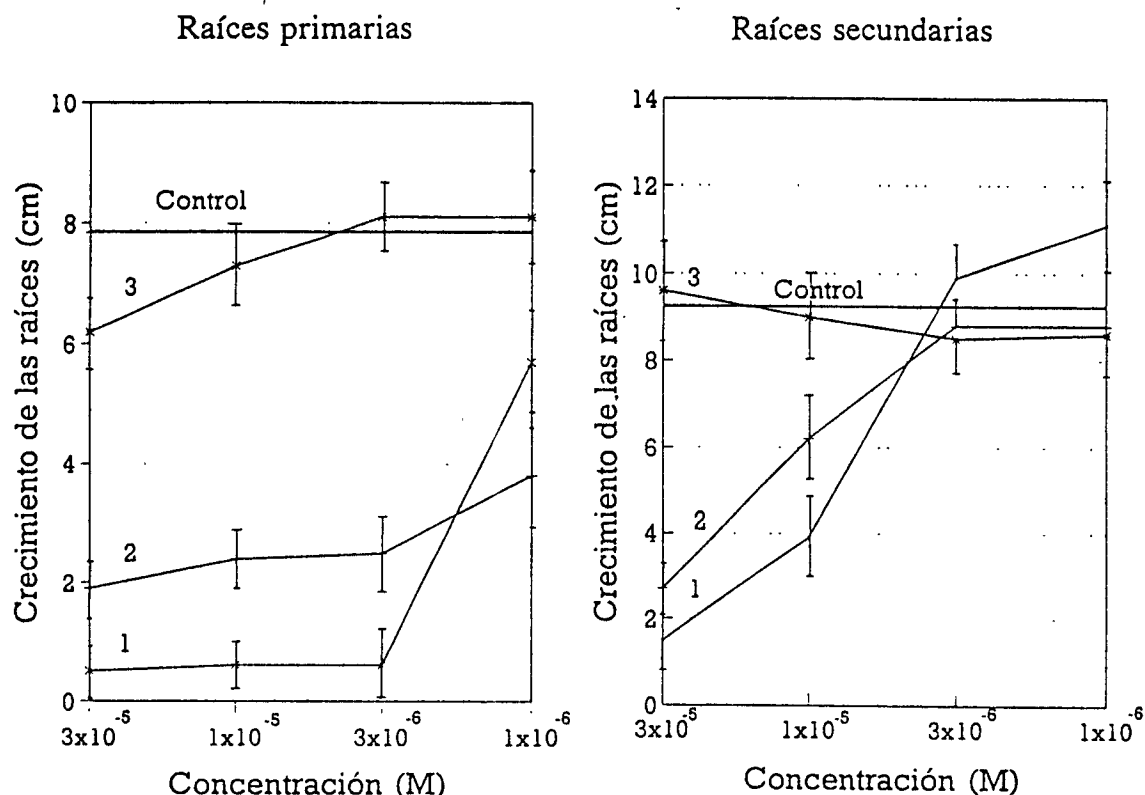
<sup>14</sup>C-JA había entrado al tallo (Tab. 1). La mayor cantidad de <sup>14</sup>C-JA absorbido por la plántula quedó en la raíz, en el tejido intermedio entre raíz y tallo y en el cariopse. En los extractos de compuestos solubles detectamos 82,0% y 74,2%, respectivamente, de la actividad aplicada de <sup>14</sup>C después de 1 y 2 días de crecimiento. Los compuestos insolubles en los tejidos totalizaron 3,6% y 4,8%, respectivamente (Tab. 1).

Además de la radioactividad total también analizamos los extractos cualitativamente por medio de cromatografía en placas finas (silica gel GF<sub>254</sub>, CHCl<sub>3</sub>: acetato de etilo: ácido acético = 14:6:1). En la solución de incubación detectamos solamente JA (R<sub>f</sub> = 0,72) en ambos extractos. En la raíz detectamos 2 metabolitos; el principal M1 aumentó significativamente a los dos días de incubación (Fig. 8). En el tejido entre raíz y tallo y en el tallo detectamos solamente el metabolito. M1. Caracterizamos ese metabolito por medio de cromatografía en columna en DEAE-Sephadex A-25 (Gräbner *et al.*,

1976). M1 se eluye con ácido acético 0,5 M en 80% metanol, lo que indica un conjugado ácido de JA, probablemente con un aminoácido (Kramell, 1990). Este resultado indica que el efecto de JA aplicado via raíz sobre el crecimiento del tallo no se debe a ese mismo compuesto. Puede ser que el metabolito de JA es el compuesto efectivo o que el mismo JA induce en la raíz cambios metabólicos que se transmiten al tallo para inducir los cambios en el crecimiento.

## EL DESARROLLO VEGETATIVO

El papel que juega el JA sobre el crecimiento vegetativo de las plantas está poco investigado. El JA y, especialmente, el JAME influyen la apertura de las estomas, pero menos eficazmente que el ABA (Satler y Thimann, 1981). Para inducir el cierre estomático se necesitan concentraciones más altas de JAME en comparación al ABA, el cierre ocurre más lentamente y la apertura de los es-



**Figura 5.** Efecto de JAME, ABA y éster metílico de CA (CAME) sobre el crecimiento de las raíces primarias y secundarias en las plántulas de trigo. Se muestra la diferencia en la longitud de las raíces durante 5 días de crecimiento en las soluciones respectivas. 1-JAME, 2-ABA, 3-CAME.

tomas después del tratamiento se ve retrasada (Raghavendra y Reddy, 1987; Zhi-Yi *et al.*, 1988). Investigaciones en cebada indicaron que el JA-Me no funciona como modulador rápido de la apertura estomática (Horton, 1991).

En plantas jóvenes de cebada todavía sin macollos, el JA y JAME en combinación con etileno promueven la formación de los mismos. Ni el etileno solo ni JA o JAME solos son capaces de inducir esos cambios morfológicos en las plantas jóvenes de cebada; exclusivamente la combinación de los dos compuestos tiene ese efecto (Dathe, 1992).

En las plantas tuberosas el JA parece jugar un papel regulatorio en la inducción de la tuberización. Yoshihara *et al.*, (1989) identificaron en las hojas de *Solanum tuberosum* el glucósido de 12-hidroxi-JA un factor capaz de inducir tuberización. También en hojas de la planta monocotiledónea, *Dioscorea batatas*, se identificó el JA como

un factor capaz de inducir tuberización si se aplica el compuesto exógenamente (Koda y Kikuta, 1991). Aunque otros análogos de JA tienen propiedades similares en la inducción de tuberización, es probable que en las especies antes citadas el JA y sus análogos influyen endógenamente el proceso de la formación de los tubérculos (Koda *et al.*, 1991).

Una función especial de JA en el desarrollo vegetativo podría ser la inducción de la proteína de almacenaje de los tejidos vegetativos (VSP, vegetative storage protein). Esa proteína muy probablemente juega un papel importante en el almacenaje temporal de nitrógeno, ya que aumenta significativamente el contenido del mismo de diferentes tejidos jóvenes. Además, cuando esos órganos empiezan a madurar y exportan nutrientes a otros órganos en desarrollo, esa proteína desaparece (Staswick, 1990). El JA es capaz de inducir dicha proteína en soja de la misma forma

**Tabla 1.** Porcentaje de radioactividad de compuestos solubles e insolubles en diferentes partes de plántulas de trigo, variedad "Hatri", que crecieron durante 1 y 2 días en una solución de  $^{14}\text{C}$ -JA.

El tejido, previamente reducido a cenizas, se extrajo con metanol: agua (80:20) y la solución acuosa se agitó con  $\text{CHCl}_3$  (pH 3.0). La radioactividad total se midió en alícuotas de los extractos (1/20).

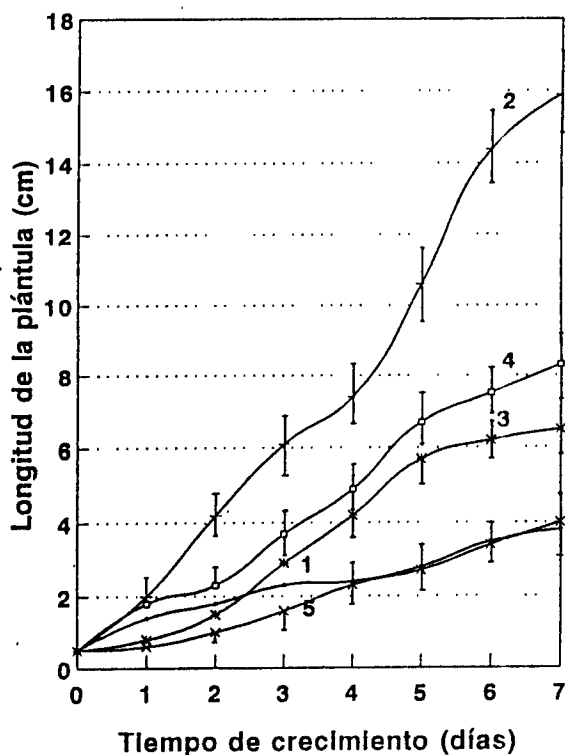
Tiempo	Radioactividad en:				Solución de incubación
	Raíz	Caryopsis	Tejido intermedio	Tallo	
<i>Compuestos solubles (%)</i>					
1 día	12,2	3,2	4,0	0,8	79,8
2 días	12,3	3,1	5,9	2,8	75,9
<i>Compuestos insolubles en los diferentes tejidos (%)</i>					
1 día	15,3	74,3	8,0	2,5	
2 días	16,0	68,2	15,9	2,9	
<i>Peso seco de los tejidos (mg)</i>					
1 día	1,20	330	3,5	1,3	
2 días	1,04	264	2,04	4,42	

que lo hacen el estrés, heridas y la eliminación de las vainas. Si se aplican inhibidores de la lipoxigenasa a la hoja via los haces vasculares, aquellos son capaces de inhibir la expresión de la proteína, pero la aplicación de JAMe en combinación con dichos inhibidores revierte el efecto de éstos permitiendo la inducción. Este resultado apoya la idea que el JA juega un papel endógeno en la regulación de la expresión de los genes para la proteína VSP (Staswich *et al.*, 1991).

El fin del desarrollo de las hojas consiste en la senescencia y caída de las mismas. En *Ficus superba* el contenido del JAMe alcanza en las hojas un contenido máximo antes de la caída del follaje, mientras que el contenido de JA no aumenta (Ueda *et al.*, 1991). Posiblemente sólo el JAMe y no el JA están implicados en la regulación endógena de la senescencia de las hojas de esa especie como en *Artemisia absinthium* (Ueda and Kato, 1980), aunque el JA y análogos promueven también la senescencia e inducen nuevas proteínas en hojas de cebada y otras especies (ver Partier, 1990). En cada forma esos resultados indican que dichos compuestos juegan un papel en la regulación endógena de la senescencia de tejidos vegetativos. Pero ese efecto no puede ser la única función de JA ya que hojas muy jóvenes de *Vicia faba* tienen también un alto contenido de ese compuesto, que no puede estar implicado en la senescencia (Knöfel *et al.*, 1984, Brückner, 1988).

## EL DESARROLLO GENERATIVO

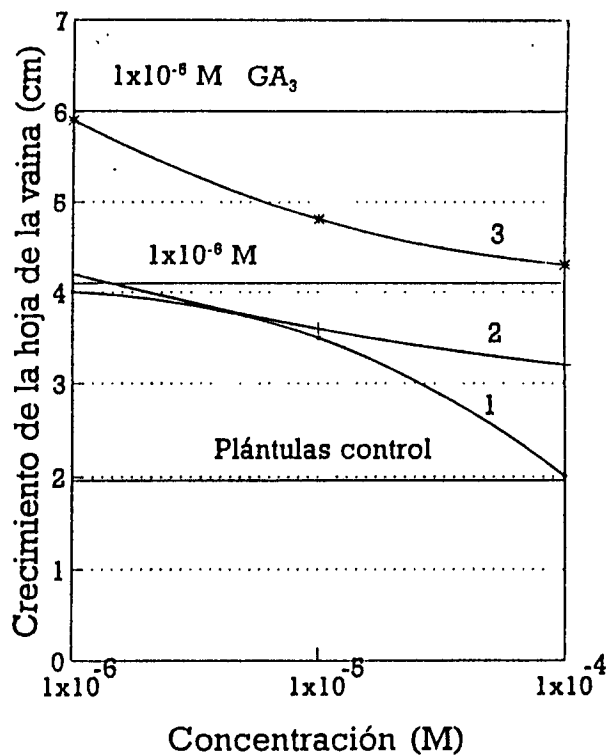
Después de la fecundación de una flor el cuaje es un proceso clave para el desarrollo del fruto. En la papaya (*Carica papaya*) investigamos las giberelinas endógenas en pedúnculos y frutos jóvenes y verdes que quedan en la planta desarrollándose. Por otra parte analizamos las giberelinas en pedúnculos y frutos jóvenes y amarillos destinados a caer. Purificamos los extractos de esos tejidos por cromatografía en columna en DEAE-Sephadex A-25 separando giberelinas libres y conjugadas. Encontramos que los frutos verdes contienen solamente GAs libres mientras que en los amarillos detectamos un gran contenido de GAs neutras. Hidrolizamos las GAs neutras y las cromatografiamos nuevamente sobre DEAE-Sephadex A-25 para trasladar la actividad biológica de las fracciones neutras a las ácidas. Al cabo de la purificación identificamos las GAs  $A_1$ , 3-epi- $A_1$ ,  $A_3$  y  $A_{55}$  por medio de cromatografía gaseosa - espectrometría de masas (Dathe *et al.*, 1991a; Fig. 9). Las  $GA_3$  y  $GA_{55}$  se encontraron en casi todos los tejidos, mientras que  $GA_1$  y 3-epi- $GA_1$  se detectaron solamente en los frutos verdes.  $GA_{55}$  es dominante en frutos amarillos y  $GA_3$  en frutos y pedúnculos verdes. Así los frutos verdes contienen las GAs biológicamente muy activas ( $GA_1$ ,  $GA_3$ ) y los amarillos la  $GA_{55}$  que es mucho menos activa.



**Figura 6.** El efecto antagónico de JAMe ( $1 \times 10^{-4}$  M) con GA<sub>3</sub> ( $1 \times 10^{-5}$  M) en el bioensayo con arroz enano "Tan-ginbozu". En una variante se aplica simultáneamente JAMe y GA<sub>3</sub> (3); en la segunda variante se aplica primero JAMe sólo 1 día antes y después la mezcla (5) y por último se preincuba con GA<sub>3</sub> por 1 día y posteriormente se aplica la mezcla (4). Se compara el crecimiento con las plántulas control en agua (1) o en GA<sub>3</sub> (2).

En la fracción de GAs conjugadas identificamos como aglucona el GA<sub>3</sub>, lo que significa que un conjugado neutro de GA<sub>3</sub> es la giberelina principal en los frutos destinados a caer. Mientras que GA<sub>3</sub> es dominante en los frutos en desarrollo, parece que la misma está eliminada de las GAs activas por conjugación en los frutos destinados a la caída (Dathe *et al.*, 1991a).

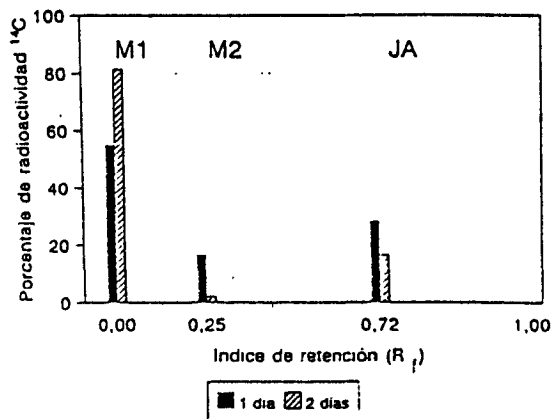
Para el análisis del posible papel que juega el JA en el desarrollo del fruto utilizamos leguminosas de grano, especialmente la soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Las investigaciones se realizaron en Cuba y las plantas se cultivaron bajo condiciones de campo. Seleccionamos de la soja, variedad G7R-315, 4 estadios del desarrollo del fruto, cuya caracterización se puede apreciar en la figu-



**Figura 7.** El efecto antagónico de diferentes análogos de JA con GA<sub>3</sub> ( $1 \times 10^{-5}$  M) en el bioensayo con arroz enano "Tan-ginbozu". Las plántulas crecieron el primer día en la solución de dichos compuestos y los siguientes 6 días en la mezcla con GA<sub>3</sub>. 1-JAMe, 2-CAME, 3-6-epi-7-iso-CAME.

ra 10. Los frutos de cada estadio se separaron en pericarpio y semilla; el pericarpio se separó en haces vasculares y el resto del pericarpio y la semilla en hilo, testa, par de cotiledones y eje embrionario. Para la determinación semicuantitativa de dicho compuesto se utilizó un radioinmunoensayo (RIA) desarrollado para el (-)-JA (Knöfel *et al.*, 1990).

En esos estudios, en todos los estadios del crecimiento, la concentración más alta del JA se encontró siempre en los haces vasculares del pericarpio; también en el hilo y la testa se determinó un alto contenido que prácticamente fue constante en el transcurso del desarrollo de la semilla, mientras que en los cotiledones y el eje embrionario se detectaron concentraciones muy bajas (Fig. 11). Esa acumulación preferente del JA en los tejidos de los haces vasculares del fruto de la soja, sugiere que este compuesto podría jugar

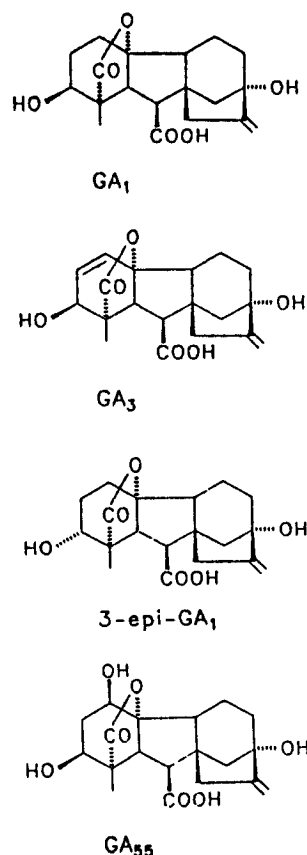


**Figura 8.** El metabolismo de  $^{14}\text{C}$ -( $\pm$ )-JA en las raíces de trigo después de 1 o 2 días de incubación en dicho compuesto.

un papel funcional en el proceso de transporte de asimilados. El aumento exclusivo de JA encontrado en el pericarpio está posiblemente vinculado con el comienzo de los procesos de la senescencia en el fruto.

La distinta distribución del JA en la semilla y el pericarpio de la soya está casi seguramente determinada por las diferentes funciones de esas partes durante la ontogénesis. Mientras que en el pericarpio, después de la maduración fisiológica ocurre un proceso de senescencia hasta la muerte, parecido al de las partes vegetativas, la semilla entra en un período de latencia hasta que comienzan los cambios de actividad por la germinación. Por esto, una inducción de la senescencia por el JA en los frutos puede esperarse sólo en el pericarpio y no en la semilla. En relación con ello puede discutirse la hipótesis de que el incremento del JA en el pericarpio esté vinculado con la regulación del aumento del transporte de asimilados a la semilla al mismo tiempo que la senescencia ocurre en esa parte del fruto (López *et al.*, 1987).

Además de JA detectamos en el pericarpio de soya otros compuestos que muestran una reactividad cruzada en el RIA. Utilizamos en esas investigaciones la variedad "Dorado", cultivada en condiciones de campo en Halle/S., Alemania, y cosechamos pericarpios (1,5 kg cada vez) en dos diferentes estadios: I. semillas que habían alcanzado 2/3 de su peso seco máximo, II. semillas adultas, es decir pericarpios al inicio de la senes-



**Figura 9.** Las estructuras de las giberelinas identificadas en los pedúnculos y frutos de *Carica papaya*.

encia visible. Luego de extracción con metanol, preparamos los extractos en fase acetato de etilo como se ha descrito (Dathe *et al.*, 1978) y los purificamos por DEAE-Sephadex A-25 (Grábner *et al.*, 1976). Detectamos en tres fracciones una reactividad cruzada con el RIA para el (-)-JA (Tabla 2).

Los compuestos neutros no se correspondieron con JAME, pero la elucidación estructural no está acabada.

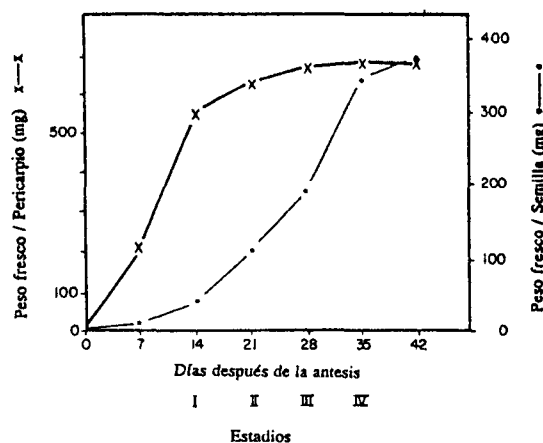
En las fracciones 3-5 identificamos JA (Meyer *et al.*, 1984; López *et al.*, 1987) y también un análogo de JA hidroxilado en la cadena lateral (Dathe y Schneider, no publicado). Purificamos las fracciones 3-5 por medio de HPLC (LiChrospher 100 RP 18, 5  $\mu\text{m}$  (MERCK LiChroCART), 4 x 125 mm,



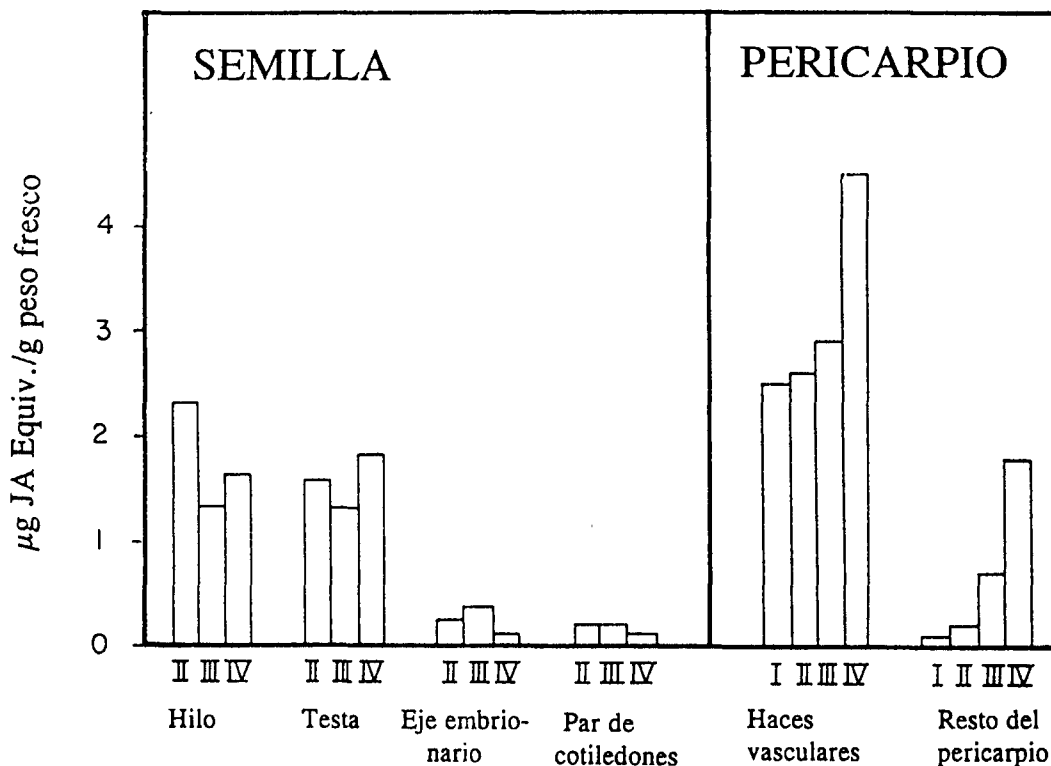
detector a 210 nm, elución de 1 ml/min con metanol: ácido acético (0,2%) = 1:1) y utilizamos una fracción eluida alrededor de JA ( $R_t = 4,5-6,5$  min). Luego de evaporar, metilamos y analizamos la fracción por medio de GC-MS (25 m x 0,2 mm, columna de metilsilicona ligada de sílica fundida, grosor del film 0,11  $\mu$ m (Hewlett-Packard Ultra 1), inyec-

**Tabla 2.** Contenido equivalente de JA (ng/g peso fresco) determinados por RIA en el pericarpio de soja en dos diferentes estadios del desarrollo. Los extractos en acetato de etilo se purificaron por medio de cromatografía en DEAE-Sephadex A-25.

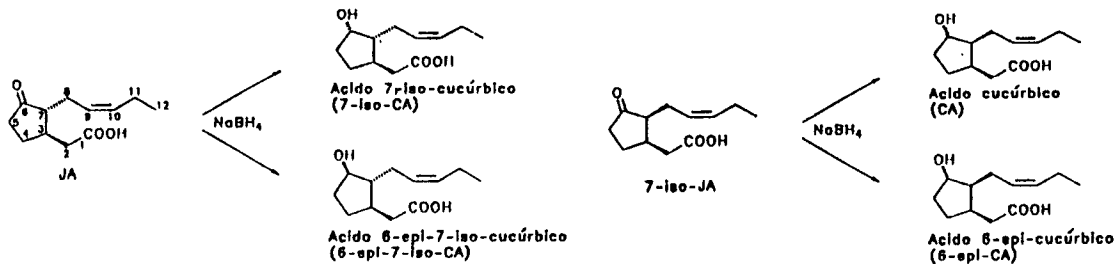
Estado	Fracciones		
	Neutras	Acidas	
		3-5 (JA)	7+8 (conj. JA)
I	66	369	397
II	1521	950	152



**Figura 10.** Estadios del desarrollo del fruto de la soja, variedad G7R-315.



**Figura 11.** Concentración de JA en las diferentes partes del fruto de la soja en los distintos estadios del desarrollo del mismo. La determinación se realizó mediante el radioinmunoensayo después de la cromatografía de los extractos de acetato de etilo sobre DEAE-Sephadex A-25.



**Figura 12.** La síntesis de análogos de CA a partir de JA y 7-iso-JA respectivamente.

ción separada, He como gas portador 2,5 ml/min; programa de temperatura: 50° C (1 min) hasta 140° C (25° C/min) y 140° C (1 min) hasta 160° C (2,5° C/min); inyección - 274° C, fuente de iones - 250° C; 70 eV). Detectamos ( $R_t = 14.333-14.448$ ) un compuesto que se corresponde, según la muestra de la fragmentación (espectro entero), con el ácido 12-hidroxi-jasmónico (Miersch *et al.*, 1991). Ese compuesto también lo detectamos por espectro entero ( $R_t = 14.381-14.460$ ) en el extracto de las semillas del estadio temprano que purificamos en la misma forma (Tab. 3).

Purificamos las fracciones 7 + 8 por medio de HPLC (LiChrospher 100 RP 18, 5  $\mu$ m (MERCK LiChroCART), 4  $\times$  125 mm, elución con metanol: ácido acético (0,2%) = 1:1, 1 ml/min, detector a 210 nm) y analizamos las diferentes fracciones con el RIA. Detectamos una reactividad cruzada en una fracción diferente de JA ( $R_t = 5,1$  min) que corresponde a conjugados de JA con aminoácidos ( $R_t = 13,4$  min), específicamente con leucina (Schneider *et al.*, 1989). La identificación no está terminada.

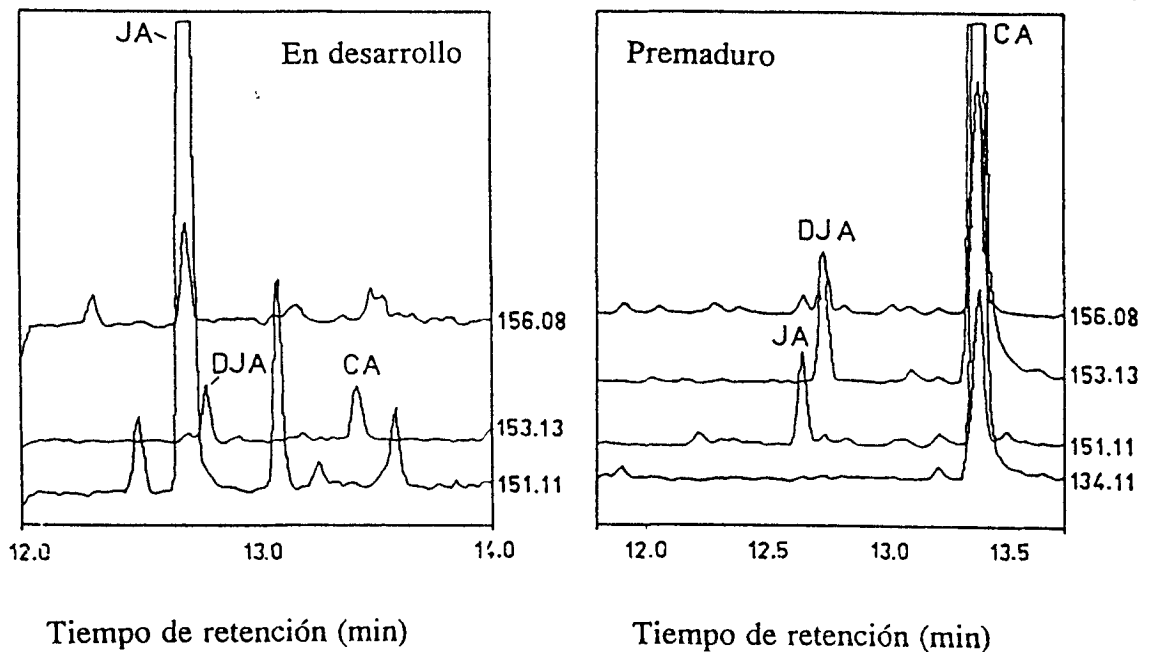
Estos resultados muestran que el contenido de JA y de un compuesto neutro demostrable con el RIA, aumenta con el desarrollo del pericarpio, específicamente con el inicio de la maduración del mismo. Adicionalmente detectamos el ácido 12-hidroxi-jasmónico aparentemente como metabolito de JA. Otros metabolitos de JA en los cuales el grupo cetónico está reducido al grupo hidroxilo no fueron detectados aunque buscamos por los mismos.

Tanto el JAME como el JA tienen efectos muy parecidos al etileno, la fitohormona clásica de la maduración de frutos (Brady y Speirs, 1991) y se-

**Tabla 3.** Identificación de ácido 12-hidroxi-jasmónico en el pericarpio y la semilla de la soya. Los iones característicos (m/z; identidad relativa en por ciento entre paréntesis) en la espectrometría de masa se comparan con los mismos del compuesto auténtico (Miersch *et al.*, 1991).

m/z	Miersch et al. (1991)	Pericarpio	Semilla
240 [M <sup>+</sup> ]	(1)	(3)	(3)
222	(2)	(5)	(5)
210	(13)	(30)	(25)
192	(7)	(15)	(15)
167	(14)	(27)	(17)
156	(14)	(65)	(45)
149	(17)	(30)	(20)
137	(9)	(12)	(14)
131	(10)	(13)	(16)
107	(14)	(20)	(10)
83	(100)	(100)	(100)

nescencia (Reid y Wu, 1991). Por ese motivo es fácil comprender que la interacción entre los dos reguladores podría ser importante para la regulación endógena de la maduración o senescencia. Así se detectó en hojas de cítricos, en frutos maduros de tomates y frutos preclimáticos de manzanas, que el JAME estimula la producción de etileno vía una actividad elevada de la enzima formadora de etileno (EFE) que canaliza la transformación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a etileno (Riov y Yang, 1987; Sa-



**Figura 13.** Cromatografía gaseosa con la espectrometría de masas (SIM, selected ion monitoring) de fracciones prepurificadas de cariopses en desarrollo y cariopses al inicio de maduración (premaduro) de centeno. DJA - ácido dihidrojasmónico

niewski *et al.*, 1987; Saniewski y Czapski, 1990). En cotiledones de pepino y frutas posclimáticas de manzanas el JAME no influye (Abeles *et al.*, 1989; Saniewski *et al.*, 1988) y en plántulas de frijol el JAME inhibe la liberación de etileno (Riov y Yang, 1987). Sobre la base de estos resultados parcialmente contradictorios investigamos en el laboratorio de Prof. Grierson, Universidad de Nottingham, la producción de etileno bajo la influencia de JAME. Medimos no sólo la liberación del etileno sino también hibridizamos el RNA aislado de los tejidos con pTOM 13, un cDNA clon para el EFE de tomate (Hamilton *et al.*, 1991). Utilizamos hojas jóvenes (longitud cerca de 7 cm) y frutos jóvenes (diámetro cerca de 3 cm). No sólo en el tallo vegetativo de plantas jóvenes (38 días) sino también en los frutos sumergidos por una hora en JAME ( $2 \times 10^{-4}$  M) ese compuesto fue capaz de aumentar la liberación del etileno. Extrajimos el RNA a partir de hojas jóvenes medidas durante 4, 8 y 12 horas en una solución de JAME ( $1 \times 10^{-4}$  M) o agua, respectivamente. Después hicimos un Northern análisis y el filtro se utilizó en la hibridación con pTOM 13. Los resultados mostraron

por primera vez que JAME es capaz de inducir la formación de RNA para la EFE en todos los tiempos investigados (Dathe *et al.*, en preparación). Si el JA o JAME influyen la senescencia por la influencia de la actividad de EFE requiere un análisis detallado del nivel endógeno de esos reguladores en comparación a la expresión de la EFE durante el desarrollo de los órganos o tejidos.

Hay resultados que dejan suponer que sustancias análogas de JA juegan un papel en la regulación de la senescencia de órganos vegetales. Así se detectó JA en el tallo generativo en desarrollo de *Equisetum arvense*, mientras que dicho tallo después de la salida de las esporas del cono y al inicio de marchitamiento, no contiene este compuesto sino un análogo, el ácido 6-epi-7-iso-cucúrbico (Dathe *et al.*, 1989). Para probarlo sintetizamos los cuatro análogos de JA o 7-iso-JA respectivamente, en los cuales el grupo cetónico está reducido a hidroxilo (Fig. 12). Caracterizamos estructuralmente los compuestos con métodos físicos y, a excepción de 7-iso-CA, pudimos detectar los demás compuestos en diferentes especies de plantas (Dathe *et al.*, 1991b;

Tabla 4. Presencia de ácido cucúrbico y análogos en diferentes especies.

COMPUESTO	ESPECIE	REFERENCIA
CA	<i>Cucurbita pepo</i> semilla	Fukui <i>et al.</i> , 1977
	<i>Botryodiplodia theobromae</i> medio de cultivo	Miersch <i>et al.</i> , 1987
	<i>Anemia phyllitidis</i> esporas	Dathe <i>et al.</i> , 1991b
	<i>Secale cereale</i> cariopses	
6-epi-CA	<i>Anemia phyllitidis</i> esporas	Dathe <i>et al.</i> , 1991b
	<i>Juglans regia</i> flores femeninas	
	<i>Secale cereale</i> cariopses	
7-iso-CA	no se detectó como compuesto endógeno	
6-epi-7-iso-CA	<i>Vicia faba</i> frutos jóvenes	Miersch <i>et al.</i> , 1989
	<i>Equisetum arvense</i> tallos fértiles	Dathe <i>et al.</i> , 1991b
	<i>Anemia phyllitidis</i> esporas	
	<i>Juglans regia</i> flores femeninas	

Tabla 4). En *Secale cereale* detectamos en cariopses jóvenes un alto contenido de JA y casi nada de CA, pero en los cariopses próximos a madurar dominó el CA y el JA casi desapareció (Fig. 13). Por el momento no se sabe si esos cambios en el contenido de los 2 compuestos son pre-requisito o consecuencia de la maduración.

## AGRADECIMIENTO

El autor expresa su agradecimiento a Monika Krohn por su asistencia técnica, a Dr. Christian Brückner, Christine Gebhardt y Eva-Maria Schneider por la realización del RIA, a Gudrun Hahn y Dr. Gernot Schneider por la realización de las corridas en HPLC y a Dr. Rubén Bottini por la revisión crítica del manuscrito en español.

## BIBLIOGRAFIA

- Abeles, F. B., W. L. Hershberger, and L. J. Dunn: Hormonal regulation, and intracellular localization of a 33-kD cationic peroxidase in excised cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 89, 664-668 (1989).
- Aldridge, D. G., S. Galt, D. Giles, and W. B. Turner: Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *J. Chem. Soc. (C)* 1623-1627 (1971).
- Brady, C. J. and J. Speirs: Ethylene in fruit ontogeny and abscission. In: *The Plant Hormone Ethylene* (Ed. A. K. Mattoo and J. C. Suttle), pp. 235-258. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Brückner, C.: Radioimmunologischer Nachweis und Strukturaufklärung von Verbindungen des Jasmonsäure-Typs in der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). Dissertation A, Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale 1988.
- Corbineau, F., R. M. Rudnicki, and D. Come: The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regul.* 7, 157-169 (1988).
- Crabalona, L.: Presence of levorotatory methyl jasmonate, methyl cis-2-(2-penten-1-yl)-3-oxocyclopentenyl acetate, in the essential oil of Tunisian rosemary. *C. R. Acad. Sci. Ser. C* 264, 2074-2076 (1967)
- Dathe, W.: Effects of jasmonic acid and ethephon on tillering to maturity in spring barley. *Ann. Bot.* 69, 1992 (in press).
- Dathe, W., S. Brown, A. Hamilton, J. Taylor, and D. Grieron: Effect of jasmonic acid and its methyl ester on the ethylene formation in young leaves and immature fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Plant Physiol.*, in preparation.
- Dathe, W., O. Miersch, and J. Schmidt: Occurrence of jasmonic acid, related compounds and abscisic acid in fertile and sterile fronds of three *Equisetum* species *Biochem. Physiol. Pflanzen* 185, 83-92 (1989).
- Dathe, W., H. Oliva, O. Miersch, J. Schmidt, I. Yamaguchi, and N. Takahashi: Endogenous gibberellins of young developing and abscising fruits of *Carica papaya* L. *Agric. Biol. Chem.* 55, 2491-2495 (1991a).
- Dathe, W., H. Rönsch, A. Preiss, W. Schade, G. Sembdner, and K. Schreiber: Endogenous plant hormones

- of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* 153, 530-535 (1981).
- Dathe, W., C. Schindler, G. Schneider, J. Schmidt, A. Porzel, E. Jensen, and I. Yamaguchi: Cucurbitic acid and its 6,7-stereoisomers. *Phytochemistry* 30, 1909-1914 (1991b).
- Dathe, W., G. Schneider, and G. Sembdner: Endogenous gibberellins and inhibitors in caryopses of rye. *Phytochemistry* 17, 963-966 (1978).
- Demole, E., E. Lederer, D. Mercier: Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* 45, 675-686 (1962).
- Farmer, E. E. and C. A. Ryan: Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134 (1992).
- Fukui, H., K. Koshimizu, Y. Yamazaki, and S. Usuda: Structures of plant growth inhibitors in seeds of *Cucurbita pepo* L. *Agric. Biol. Chem.* 41, 189-194 (1977).
- Gräbner, R., G. Schneider, and G. Sembdner: Gibberelline - XLIII. Mitteilung. Fraktionierung von Gibberellinen, Gibberellinkonjugaten und anderen Phytohormonen durch DEAE-Sephadex-Chromatographie. *J. Chromatogr.* 121, 110-115 (1976).
- Hamilton, A. J., M. Bouzayen, and D. Grierson: Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7434-7437 (1991).
- Horton, R. F.: Methyl jasmonate and transpiration in barley. *Plant Physiol.* 96, 1376-1378 (1991).
- Knöfel, H.-D., C. Brückner, R. Kramell, G. Sembdner, and K. Schreiber: A radioimmunoassay for jasmonic acid. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 179, 317-325 (1984).
- Knöfel, H.-D., C. Brückner, R. Kramell, G. Sembdner, and K. Schreiber: Radioimmunoassay for the natural plant growth regulator (-)-jasmonic acid. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 186, 387-394 (1990).
- Knöfel, H.-D. and D. Gross: Synthesis of racemic [2-<sup>14</sup>C] jasmonic acid. *Z. Naturforsch.* 43c, 29-31 (1988).
- Koda, Y. and Y. Kikuta: Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. *Plant Cell Physiol.* 32, 629-633 (1991).
- Koda, Y., Y. Kikuta, H. Tazaki, Y. Tsujino, S. Sakamura, and T. Yoshihara: Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* 30, 1435-1438 (1991).
- Kramell, R.: Beiträge zur Chemie der Derivatisierung und Racemattrennung der Jasmonsäure. Dissertation A, Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale 1990.
- Krupina, M. V. and W. Dathe: Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Z. Naturforsch.* 46c, 1127-1129 (1991).
- Lopez, R. W., W. Dathe, C. Brückner, O. Miersch and G. Sembdner: Jasmonic acid in different parts of the developing soybean fruit. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 182, 195-201 (1987).
- Mason, H. S. and J. E. Mullet: Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding and jasmonic acid. *Plant Cell* 2, 569-579 (1990).
- Meyer, A., O. Miersch, C. Buttner, W. Dathe, and G. Sembdner: Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regul.* 3, 1-8 (1984).
- Miersch, O., A. Preiss, G. Sembdner, and K. Schreiber: (+)-7-iso-jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* 26, 1037-1039 (1987).
- Miersch, O., G. Schneider, and G. Sembdner: Hydroxylated jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* 30, 4049-4051 (1991).
- Miersch, O., G. Sembdner, and K. Schreiber: Occurrence of jasmonic acid analogues in *Vicia faba*. *Phytochemistry* 28, 339-340 (1989).
- Parthier, B.: Jasmonates: Hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *J. Plant Growth Regul.* 9, 57-63 (1990).
- Parthier, B., C. Brückner, W. Dathe, B. Hause, G. Herrmann, H.-D. Knöfel, H.-M. Kramell, R. Kramell, J. Lehmann, O. Miersch, S. Reinbothe, G. Sembdner, C. Wasternack, and U. zur Nieden: Jasmonates: Metabolism, biological activities and mode of action in senescence and stress responses. In: *Plant Growth Substances 1991* (in press).
- Raghavendra, A. S. and K. B. Reddy: Action of proline on stomata differs from that of abscisic acid, G-substances, or methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 83, 732-734 (1987).
- Reid, M. S. and M.-J. Wu: Ethylene in flower development and senescence. In: *The Plant Hormone Ethylene* (Ed. A. K. Mattoo and J. C. Suttle), pp. 215-234. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Riov, J. and S. F. Yang: Effects of abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MJ) on ethylene production. *Plant Physiol.* 83 (Suppl.), 175 (abstract).
- Saniewski, and J. Czapski: The effect of aminooxyacetic acid on ethylene production induced by methyl jasmonate in tomatoes. *Biol. Plant.* 32, 218-222 (1990).
- Saniewski, M., J. Nowacki, and J. Czapski: The effect of methyl jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 129, 175-180 (1987).
- Saniewski, M., J. Nowacki, E. Lange and J. Czapski: The effect of methyl jasmonate on anthocyanin accumulation, ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in apples. *Fruit Sci. Rep.* 15, 97-102 (1988).

- Satler, S. O. and K. V. Thimann: Le jasmonate méthyle: nouveau et puissant promoteur de la senescence des feuilles. Comptes rendus de l'Académie de Sciences Paris, Série III 293, 735-740 (1981).
- Schneider, G., R. Kramell, and C. Brückner: Separation of diastereomeric amino acid conjugates of jasmonic acid. J. Chromatogr. 483, 459-462 (1989).
- Sembdner, G., E. Borgmann, G. Schneider, H.-W. Liebisch, O. Miersch, G. Adam, M. Lischewski, and K. Schreiber: Biological activity of some conjugated gibberellins. Planta 132, 249-257 (1976).
- Sembdner, G., W. Dathe, C. Bergner, and H. Rönsch: Isolierung und biologische Aktivität eines neuen Wachstumsregulators von *Vicia faba* L. Wiss. Z. E.-M.-A. Univ. Greifswald, mathem.-naturwiss. Reihe 32, 113-116 (1983).
- Sembdner, G., G. Herrmann, and W. Schliemann: Growth. Progr. Bot. 51, 134-164 (1989).
- Sembdner, G., A. Meyer, O. Miersch, and C. Brückner: Metabolism of jasmonic acid. In: Plant Growth Substances 1988 (Ed. R. P. Pharis and S. B. Rood), pp. 374-379. Springer-Verlag Berlin 1990.
- Staswick, P. E.: Novel regulation of vegetative storage protein genes. Plant Cell 2, 1-6 (1990).
- Staswick, P.E., J.-F. Huang, and Y. Rhee: Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. Plant Physiol. 96, 130-136 (1991).
- Takahashi, N., B. O. Phinney, and J. MacMillan: Gibberellins. Springer-Verlag New York Inc. 1991.
- Ueda, J. and J. Kato: Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). Plant Physiol. 66, 246-249 (1980).
- Ueda, J., T. Mizumoto, and J. Kato: Quantitative changes of abscisic acid and methyl jasmonate correlated with vernal leaf abscission of *Ficus superba* var. *japonica*. Biochem. Physiol. Pflanzen 187, 203-210 (1991).
- Yoshihara, T., E. A. Omer, H. Koshino, S. Sakamura, Y. Kikuta, and Y. Koda: Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). Agric. Biol. Chem. 53, 2835-2837 (1989).
- Zhi-Yi, T., B. Veierskov, J. Park and K. V. Thimann: Multiple actions of abscisic acid in senescence of oat leaves. J. Plant Growth Regul. 7. 213-226 (1988).