



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTRÉS OXIDATIVO, RESPUESTA
ANTIOXIDANTE Y TOLERANCIA A BAJA
TEMPERATURA EN MICROPLANTAS DE *Solanum
tuberosum* L.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. MARTHA ELENA MORA HERRERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. HUMBERTO ANTONIO LÓPEZ DELGADO

México, D.F.

OCTUBRE, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

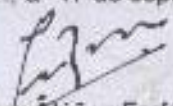
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MARTHA ELENA MORA HERRERA** con número de cuenta 79420938, con la tesis titulada: "**ESTRÉS OXIDATIVO, RESPUESTA ANTIOXIDANTE Y TOLERANCIA A BAJA TEMPERATURA EN MICROPLANTAS DE Solanum tuberosum L.**", realizada bajo la dirección del Dr. Humberto Antonio López Delgado.

Presidente: Dr. Francisco Alfonso Larqué Saavedra
Vocal: Dra. Rocío Cruz Ortega
Vocal: Dr. César Mateo Flores Ortíz
Vocal: Dr. Carlos Trejo López
Secretario: Dr. Humberto Antonio López Delgado
Suplente: Dr. Irineo Torres Pacheco
Suplente: Dr. Víctor Chávez Avila

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de septiembre de 2007.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas.
- Al laboratorio de Fisiología y Biotecnología del Programa Nacional de Papa de Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Reg 57324 y Proyecto SEP-2003-CO2-45016/A-1.
- A la Secretaría de Educación, Cultura y Bienestar Social y el Consejo mexiquense de Ciencia y Tecnología (SECYBS-COMECyT) promoción 2003.
- A la Universidad Autónoma del Estado de México.
- A los Doctores HUMBERTO ANTONIO LÓPEZ DELGADO, MA. DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA y VICTOR MANUEL CHAVEZ ÁVILA miembros del Comité Tutorial por sus valiosas enseñanzas e innumerables aportaciones a lo largo de los estudios de doctorado.
- A los Miembros del Jurado por todas las contribuciones hechas para mejorar este trabajo.

DR. ALFONSO LARQUÉ SAAVEDRA

DRA. MA. DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

DR. CESAR FLORES ORTIZ

DR. CARLOS TREJO LÓPEZ

Dr. HUMBERTO ANTONIO LÓPEZ DELGADO

DR. IRINEO TORRES PACHECO

DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ ÁVILA

Al Dr. Juan Nuñez Farfán y la Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas, por su confianza y apoyo.

Al Ing. Víctor Magallanes por la revisión y edición del trabajo.

Al M en C. Jorge Fajardo Guel por su apoyo.

A Beatriz Abad Trujillo-Villagarcía, por su ayuda técnica y cariño incondicional.

A mis compañeros de laboratorio: Ma. Teresa Romero Romero, Ricardo Martínez. Gutiérrez, Martha Alvarado Ordoñez y Diana Flores García por su ayuda y amistad.

A la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por su asesoría.

Al M. en C. Javier González Damián por su apoyo en resolver mis dudas.

Al M. en Com. Luis Alfonso Guadarrama Rico y a la Q.F.B Guadalupe Santamaría González por su confianza y apoyo.

A la Dra. Josefina Herrera Santoyo por su valiosa ayuda.

Pensamiento.....

Un Recuerdo que Dejo

*¿Con qué he de irme?
¿Nada dejaré en pos de mí sobre la tierra?
¿Cómo ha de actuar mi corazón?
¿Acaso en vano venimos a vivir,
a brotar sobre la tierra?
Dejemos al menos flores
Dejemos al menos cantos
Nezahualcoyótl*

Con mucho cariño dedico este trabajo a mis hijas Helena y Eugenia y a mi esposo Jorge que siempre me apoyaron.

A mi madre Delfina Herrera

Y a mis hermanos, Leticia, Javier, Bere, Cesar e Ivonne, no tengo palabras para agradecerles su cariño

Podré olvidar por unos instantes a tantas personas que con su sola presencia me ayudaron cuando más lo necesite, pero el alma está llena de ellas, gracias a todas.

ÍNDICE	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
ABREVIACIONES	v
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	3
2 ANTECEDENTES	4
2.1 Origen e importancia del cultivo de la papa.	4
2.1.1 Reproducción del cultivo de la papa.	5
2.1.2 Problemas del cultivo de la papa.	7
2.2 Estrés oxidativo.	9
2.2.1 Fuentes de producción de ERO.	9
2.2.2 Función de las ERO en las respuestas a factores de estrés.	13
2.3 Mecanismos de defensa contra ERO.	18
2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos.	19
2.3.1.1 <i>Superóxido dismutasa.</i>	19
2.3.1.2 <i>Catalasas.</i>	20
2.3.1.3 <i>Peroxidasas.</i>	23
2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos.	24
2.3.2.1 <i>Ácido ascórbico.</i>	25
2.4 Factores bióticos y abióticos en el estrés oxidativo.	27
2.4.1 Estrés por bajas temperaturas.	28
2.5 Ácido abscísico.	33
2.5.1 EL ABA y el estrés oxidativo.	36
2.5.2 ABA en la inducción de tolerancia al frío.	37
2.6 El H ₂ O ₂ en la inducción de tolerancia al frío.	39
2.6.1 Efectos del H ₂ O ₂ en la papa.	40
3 MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 Material biológico.	41
3.2 Condiciones de cultivo.	41

3.3 Medios de cultivo.	41
3.4 Solución concentrada de ácido abscísico (ABA).	42
3.5 Soluciones de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).	42
3.6 Siembra en suelo.	42
3.7 Exposición a baja temperatura (frío).	43
3.8 Evaluación de la supervivencia.	43
3.9 Incubaciones en H ₂ O ₂ .	43
3.1 Descripción de los experimentos.	44
3.10.1 Modelo de supervivencia a baja temperatura.	44
3.10.2 Supervivencia en microplantas pretratadas con ABA o H ₂ O ₂ .	46
3.10.2.1 Evaluación de la toxicidad del tratamiento de ABA.	46
3.10.2.2 Evaluación de la toxicidad del tratamiento de H ₂ O ₂ .	46
3.10.2.3 Efecto de la inundación (hipoxia-anoxia) en las preincubaciones de H ₂ O ₂ .	47
3.10.3 Cuantificación de las actividades enzimáticas antioxidantes y contenidos de H ₂ O ₂ y AA.	47
3.10.4 Subcultivo sin ABA o trasplante en invernadero de microplantas pretratadas con ABA.	48
3.11 Técnicas empleadas.	49
3.11.1 Cuantificación de la actividad enzimática de la CAT.	49
3.11.2 Cuantificación de la actividad enzimática de la APX.	50
3.11.3 Cuantificación de la actividad enzimática de la POX.	51
3.11.4 Cuantificación de la actividad de la AO.	51
3.11.5 Cuantificación del contenido del AA.	52
3.11.6 Evaluación de la actividad enzimática de la CAT en geles nativos.	53
3.11.7 Cuantificación del contenido de proteína.	54
3.11.8 Cuantificación del contenido de H ₂ O ₂ .	54
4 RESULTADOS	56
4.1 Efecto en microplantas del pretratamiento con ABA o H ₂ O ₂ .	56
4.1.1 Efecto en microplantas del pretratamiento con ABA.	56

4.1.1.1 <i>Supervivencia de microesquejes al frío.</i>	59
4.1.2 <i>Supervivencia de plantas pretratadas con H₂O₂.</i>	60
4.1.2.1 <i>Supervivencia de microplantas preincubadas con H₂O₂ al frío.</i>	60
4.1.2.1.1 <i>Efecto de las incubaciones de H₂O₂ en microplantas.</i>	62
4.1.2.1.2 <i>Efecto de la inundación (hipoxia-anoxia) en microplantas incubadas en H₂O₂.</i>	63
4.2 <i>Efecto de ABA en las respuestas oxidativas y antioxidativas.</i>	64
4.2.1 <i>Efecto del ABA en la actividad enzimática de la CAT.</i>	65
4.2.2 <i>Efecto del ABA en la actividad enzimática de la APX.</i>	68
4.2.3 <i>Efecto del ABA en la actividad enzimática de la POX.</i>	69
4.2.4 <i>Efecto del ABA en el contenido de H₂O₂.</i>	70
4.2.5 <i>Efecto del ABA en la actividad enzimática de la AO.</i>	71
4.2.6 <i>Efecto del ABA en el contenido del AA.</i>	72
4.3 <i>Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática antioxidante.</i>	73
4.3.1 <i>Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática de la CAT.</i>	73
4.3.2 <i>Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática de la APX.</i>	74
4.3.3 <i>Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática de la POX.</i>	75
4.4 <i>Efecto del subcultivo sin ABA o trasplante en invernadero de microplantas pretratadas con ABA.</i>	76
4.4.1 <i>Efecto del subcultivo sin ABA.</i>	77
4.4.1.1 <i>Efecto del subcultivo sin ABA en las actividades enzimáticas de CAT, APX y POX, y contenido de H₂O₂.</i>	79
4.4.2 <i>Efecto del trasplante en condiciones de invernadero de microplantas pretratadas con ABA.</i>	83
5 DISCUSIÓN	85
5.1 <i>Efecto del ABA en la inducción de tolerancia al frío.</i>	85
5.2 <i>Efecto del ABA en las respuestas oxidativas y antioxidativas.</i>	88
5.2.1 <i>Efecto del ABA en la actividad enzimática de la CAT.</i>	89
5.2.2 <i>Efecto del ABA en las actividades enzimáticas de la APX y POX, y contenido de H₂O₂.</i>	92

5.2.3 Efecto del ABA en el contenido de AA y la actividad de la AO.	95
5.3 Efecto del H ₂ O ₂ en la inducción de tolerancia al frío.	100
5.4 Efecto del subcultivo sin ABA o trasplante en invernadero de microplantas pretratadas con ABA	103
6 CONCLUSIONES	106
6.1 PERSPECTIVAS	107
7 LITERATURA CITADA	108
8 ANEXOS	131
1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962, MS).	131
2. Gel nativo para actividad de la catalasa.	134
3. Calibración del marcador de alto peso molecular.	136
4. Recuperación de microplantas preincubadas en ABA en condiciones de invernadero.	138
5. Reactivos.	139
6. Equipo.	142

ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS Y TABLAS

Pág.

- Esquema 1.** Fuentes de origen de especies reactivas de oxígeno en la célula vegetal (tomada con modificaciones de Bhattacharjee, 2005). **13**
- Esquema 2.** Diagrama de la participación del H₂O₂ en las rutas de señalización en la expresión génica (tomado y modificado de Xiong *et al.*, 2002). **17**
- Esquema 3.** Principales mecanismos de defensa antioxidante en la célula. **19**
- Esquema 4.** Diagrama de flujo de las evaluaciones de supervivencia realizadas con microplantas pretratadas con ABA o H₂O₂. **45**
- Esquema 5.** Diagrama de flujo de las evaluaciones de crecimiento, rendimiento, actividades enzimáticas, H₂O₂ y AA, en microplantas preincubadas en ABA o H₂O₂. **48**
- Cuadro 1.** Clasificación de las catalasas basada en sus propiedades de expresión (Willekens *et al.*, 1995). **21**
- Figura 1.** Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 4 semanas de cultivo incubadas con diferentes concentraciones de ABA, trasplantadas al suelo y expuestas al frío (-6 ± 1°C) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 4-10 repeticiones ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **57**
- Figura 2.** Longitud del tallo de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 4 semanas de cultivo, incubadas en diferentes concentraciones de ABA. Los resultados son el promedio de 36 microplantas ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **58**
- Figura 3.** Longitud de tallos y raíces de microplantas de *S. tuberosum* variedad Alpha de 4 semanas de cultivo con diferentes concentraciones de ABA. **58**
- Figura 4.** Supervivencia de microesquejes provenientes de microplantas de 28 días de cultivo (± 2 días) de *S. tuberosum* (papa) variedades Alpha y Atlantic, trasplantados al suelo y expuestos al frío (-6 ± 1°C) durante 0-8 horas. Los resultados son el promedio de 4-10 repeticiones ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **60**

Figura 5. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días en medio MS, provenientes de esquejes preincubados en H₂O₂ durante 1 hora, trasplantadas al suelo y expuestas al frío (-6 ± 1°C) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 4-10 experimentos ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **61**

Figura 6. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 28 días de cultivo, preincubadas en H₂O₂ durante 1 hora, trasplantadas al suelo y expuestas al frío (-6 ± 1°C) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 4-10 repeticiones ± e.s.; (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **62**

Figura 7. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 28 días de cultivo en medio MS, preincubadas en H₂O₂ durante 1 hora y trasplantadas al suelo. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **63**

Figura 8. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* (papa) variedades Alpha y Atlantic de 28 días de cultivo, incubados 1 hora en agua (inundación), trasplantadas al suelo y expuestas al frío (-6 ± 1°C) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 6-7 experimentos ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **64**

Figura 9. Actividad enzimática de la catalasa de plantas de *S. tuberosum* (papa) de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 µM, en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo, y c) después de 4 horas de exposición al frío (-6 ± 1°C). Los resultados son el promedio de 5-6 repeticiones ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05). **66**

Figura 10. Zimogramas de la actividad enzimática de la catalasa de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 µM. Los números indican el número de carril y las letras las isoenzimas de la catalasa. **67**

Figura 11. Actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa (APX) de plantas de *S. tuberosum* (papa) de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo, y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son el promedio de 5-6 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $p < 0.05$). 68

Figura 12. Actividad enzimática de la peroxidasa (POX) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M, en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son el promedio de 5-6 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$). 69

Figura 13. Contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M, en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$). 70

Figura 14. Actividad de la ascorbato oxidasa (AO) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M por 28 días. Los resultados son el promedio de 6 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$). 71

Figura 15. Contenido de ácido ascórbico (AA) y AA total (AA+DHA) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μ M. Los resultados son el promedio de 7 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$). 72

Figura 16. Longitud del tallo de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M ("Pre-ABA", Fase 1), y después subcultivadas por otros 28 días a medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 48 microplantas \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$). 78

Figura 17. Peso fresco de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días en medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 48 microplantas \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$). **79**

Figura 18. Actividad enzimática de la catalasa de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días a medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **80**

Figura 19. Actividad enzimática de la APX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 (testigo) y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días a medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **81**

Figura 20. Actividad enzimática de la POX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1) y después subcultivadas 28 días más en medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **82**

Figura 21. Contenido de H_2O_2 de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días en medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **83**

Figura 22. Crecimiento de plantas de papa previamente incubadas en 0 (A, control) y 10 μ M de ABA (B) a los 30 días de cultivo en condiciones de invernadero. **138**

Figura 23. Recuperación en invernadero de microplantas pretratadas con 0 (A, control) y 10 μM (B) de ABA, después de 15 días del trasplante en suelo y exposición al frío por 4 horas. **138**

Tabla 1. Contenido total de ácido ascórbico (AA+DHA), AA (reducido) y DHA (oxidado) de microplantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μM . Los resultados son promedios de 7 repeticiones. Valores con igual letra en la misma columna son estadísticamente similares (Tukey, $P < 0.05$). **73**

Tabla 2. Actividad enzimática de la catalasa (CAT) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS, en tres etapas: a) 1 hora de incubación en H_2O_2 15 mM; b) después del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son promedios de 3-6 experimentos \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **74**

Tabla 3. Actividad enzimática de la APX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS, en tres etapas: a) 1 hora de incubación en H_2O_2 15 mM; b) después del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son promedios de 3-6 repeticiones \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **75**

Tabla 4. Actividad enzimática de la POX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS, en tres etapas: a) 1 hora de incubación en H_2O_2 15 mM; b) después del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son promedios de 3-6 experimentos \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **76**

Tabla 5. Evaluación de plantas de papa de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas en condiciones de invernadero por 120 días. Las plantas se incubaron previamente en condiciones *in vitro* 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μM (Pre-ABA, Fase 1). Los resultados son el promedio de 48 plantas por tratamiento. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$). **84**

RESUMEN

Se evaluó el efecto del ácido abscísico (ABA) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la tolerancia a baja temperatura ($-6 \pm 1^\circ C$), en microplantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic. Esquejes de planta *in vitro* se incubaron en 0, 0.01, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5 y 10 μM , de ABA durante 28 días, las plantas obtenidas se trasplantaron en suelo, y después de 24 horas se expusieron a baja temperatura por 4 horas, de igual manera se preincubaron microesquejes o microplantas completas (28 días de edad) en 0, 1, 1, 5, 15, 25 y 50 mM de H_2O_2 durante 1 hora; y después los microesquejes se incubaron 4 semanas en medio MS. Las microplantas se trasplantaron en suelo, y después de 24 horas se expusieron a baja temperatura por 4 horas. El tratamiento 10 μM de ABA incrementó la supervivencia a la exposición a baja temperatura en la variedad Alpha 66.73% y en la variedad Atlantic 203.8% con respecto a los testigos. Sin embargo, este tratamiento inhibió el crecimiento de tallos y raíces en un 90% en ambas variedades con respecto a los testigos. El tratamiento con 15 mM de H_2O_2 en microplantas completas, incrementó la sobrevivencia a frío, en la variedad Alpha en 54.23% y en la variedad Atlantic en 52.98% con respecto a los testigos, este incremento se vio influido por estrés por inundación (hipoxia-anoxia). Mientras que el tratamiento de 5 mM de H_2O_2 en microesquejes sólo incrementó la supervivencia en la variedad Atlantic. La variedad Atlantic es más sensible a la baja temperatura.

Se evaluaron las actividades de enzimas antioxidantes y los contenidos de ácido ascórbico (AA) y H_2O_2 , para determinar si la tolerancia a baja temperatura inducida por ABA y H_2O_2 , se relaciona al estrés oxidativo y a las respuestas antioxidantes en las microplantas. Las cuantificaciones de catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POX) y H_2O_2 , se realizaron en tres etapas; a) a los 28 días de incubación en ABA o después de la preincubación en H_2O_2 , b) después del trasplante en suelo, y c) al término de 4 horas de exposición a baja temperatura. El contenido de AA y la actividad de la ascorbato oxidasa (AO) se cuantificaron en plantas de 28 días de incubación *in vitro* con ABA 0 y 10 μM .

El tratamiento de ABA incrementó la actividad de APX, POX, AO y el contenido de H₂O₂ y AA; y disminuyó la actividad de la CAT. Estas respuestas se mantuvieron en general, en las tres etapas evaluadas. La inhibición de la actividad de CAT fue confirmada en geles nativos de actividad, además, se observaron tres isoenzimas de CAT. El tratamiento de ABA inhibió las isoenzimas de peso molecular aproximado de 505 y 391 kDa, e incrementó la de 228 kDa. Este es el primer reporte de inhibición de CAT por efecto del ABA. Los resultados sugieren que las respuestas coordinadas de los antioxidantes y el H₂O₂, estén relacionadas con tolerancia al frío.

En la preincubación de H₂O₂, la actividad CAT, APX y POX y el contenido de H₂O₂, no tuvieron cambios significativos con respecto a los controles en las tres etapas evaluadas, lo que sugiere que el modelo empleado de incubación en H₂O₂, no fue apropiado para relacionar las respuestas de H₂O₂ con la tolerancia a baja temperatura y las respuestas a ABA.

El ABA incrementó la supervivencia, pero inhibió el crecimiento del tallo hasta en 91%, por lo que, se evaluó la recuperación del efecto del ABA en condiciones *in vitro* e invernadero.

Cuando las microplantas incubadas en ABA se cultivaron en medio MS sin ABA por 28 días, la longitud del tallo aumentó 10.4 y 6.9 veces, mientras que los testigos crecieron en sólo 0.6 y 0.36 veces para Atlantic y Alpha, respectivamente. Las actividades enzimáticas de la APX, POX y el contenido de H₂O₂ disminuyeron al nivel de los testigos, mientras que la actividad de CAT incrementó en ambas variedades. Las microplantas recuperadas por 120 días en condiciones de invernadero no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. El ABA no indujo efectos a largo plazo sobre la producción de tubérculos. Estos resultados demuestran el potencial del ABA en la inducción de tolerancia a baja temperatura en microplantas transferidas al suelo. Las respuestas al ABA estuvieron asociadas al sistema antioxidante y al contenido de H₂O₂ en la tolerancia al frío de la papa.

ABSTRACT

The effect of abscisic acid (ABA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) was evaluated on the tolerance to low temperature ($-6 \pm 1^\circ C$), in microplants of *S. tuberosum* (cv Alpha and Atlantic). Single nodal cuttings were incubated in ABA 0 (control), 0.01, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5 y 10 μM for 28 days. The plants obtained were transferred to soil, after 24 hours they were exposed to low temperature for 4 hours. Similarly, nodal cuttings or whole microplants (28 days old) were pretreated with H_2O_2 at concentrations of 0, 1, 1, 5, 15, 25 y 50 mM, subsequently the nodal cuttings were cultured in MS medium for 28 days. The microplants were transferred to soil and after 24 hours they were exposed to low temperature for 4 hours.

ABA 10 μM treatment increased the survival to low temperature. Alpha cultivar increased the survival 66.73% and Atlantic cultivar 203.8% respect to the controls. However, this treatment strongly inhibited 90% the growth of stems and roots in both cultivars respect to the controls. H_2O_2 15 mM treatment increased the survival to low temperature on whole microplants respect to the controls. In Alpha the survival increased 54.23% and in Atlantic 52.98%, this increase was influenced by flooding stress (hypoxia-anoxia). Whereas, H_2O_2 5 mM treatment on nodal cuttings only increased the survival in Atlantic. It was confirmed that Atlantic was more sensitive to low temperature than Alpha.

Antioxidant enzyme activities, ascorbic acid (AA) and H_2O_2 contents were quantified, in order to test if the tolerance responses to low temperature induced by ABA and H_2O_2 were related to oxidative stress and antioxidative responses in potato microplants. Catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX) and H_2O_2 , were measured in 3 stages; a) 28 days of ABA treatment or after H_2O_2 pretreatment, b) after transferring to soil, and c) 4 hours after low temperature treatment. AA content and ascorbate oxidase (AO) activity were quantified in microplants incubated 28 days on ABA 0 and 10 μM . ABA treatment increased APX, POX, AO activities and H_2O_2 and AA contents, and decreased CAT activity. These responses were similar in the 3 stages

evaluated. The CAT activity inhibition was also confirmed by native gels, 3 isoenzymes of CAT were observed. ABA treatment inhibited CAT isoenzymes with approximately 505 and 391 kDa molecular weight and one isoenzyme of 228 kDa was enhanced.

This is the first report of inhibition of CAT by ABA. It is suggested that the coordinate response between antioxidants and H₂O₂, were related with low temperature tolerance.

H₂O₂ pretreatment did not induce difference respect to the controls in CAT, APX and POX activities and H₂O₂ content in the three stages evaluated. It is suggested that the model of pretreatment with H₂O₂ used in this research was not suitable to relate the responses to H₂O₂ and tolerance to low temperature with ABA and the responses induced by H₂O₂.

ABA treatment increased the survival, but inhibited stems growth up to 91%, therefore; the recovery was evaluated *in vitro* and glasshouse condition. When the microplants cultivated on ABA were cultivated in ABA free-medium for 28 days, the stems length increased 10.4 and 6.9 times, whereas the controls grew only 0.6 and 0.36 times for Atlantic and Alpha respectively.

APX and POX activities and H₂O₂ content diminished to levels not different to controls, whereas CAT activity increased to levels not different to controls in both cultivars. No differences were obtained for any of the parameters evaluated in microplants transferred for 120 days to a glasshouse for recovery. ABA did not induce long term effects on tuber production. These results demonstrate the potential of ABA in the induction of freezing tolerance in microplants transferred to soil. Responses to ABA were associated with the antioxidant system and H₂O₂ content in the induction of freezing tolerance in potato.

ABREVIATURAS

AA ácido ascórbico o ascorbato

ABA ácido abscísico

AO ascorbato oxidasa

APX ascorbato peroxidasa

CAT catalasa

DHA dehidroascorbato

ERO especies reactivas de oxígeno

H₂O₂ peróxido de hidrógeno

MS medio de cultivo Murashige y Skoog

POX peroxidasa

I. INTRODUCCIÓN

En México y muchos países, el cultivo de la papa es de importancia económica y alimenticia. Este cultivo es afectado por enfermedades causadas por bacterias, hongos, virus, fitoplasmas y plagas, y por factores ambientales tales como: el cambio global de la temperatura, radiación UV, lluvia ácida, sequías, e inundaciones, entre otros factores inductores de estrés que afectan el rendimiento agronómico y el manejo de germoplasma en general.

Un factor que origina estrés en el sistema de producción de semilla *in vitro*-invernadero-campo en el cultivo de la papa es el frío. En zonas productoras de papa como el Valle de Toluca las temperaturas disminuyen a bajo cero en invierno, en el invernadero, lo que ocasiona daños en la productividad, así como incremento en los costos de producción.

Los cambios ambientales, el uso de variedades sensibles a enfermedades, la contaminación y el uso excesivo de los suelos, obligan a modificar continuamente las prácticas de manejo de los cultivos, lo que incide en los costos de producción y aumenta el riesgo de contaminación de alimentos y ambiente.

En México, el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) opera programas encaminados a generar sistemas o métodos de manejo integrado, en el cultivo de la papa, con los cuales se busca reducir costos, incrementar la productividad y evitar impactar al medio ambiente a través del uso de variedades obtenidas por mejoramiento genético tradicional que sean más tolerantes a enfermedades y a factores de estrés abiótico, con un alto rendimiento para consumo humano y calidad para la industria, con ello se disminuirá el uso de agroquímicos.

Por otro lado, el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología del Programa Nacional de Papa del INIFAP, ha trabajado en los últimos 10 años sobre las respuestas fisiológicas de tolerancia a estrés biótico y abiótico, para contribuir a los sistemas de manejo integrado. Los estudios han mostrado que la inducción de tolerancia y aclimatación a diferentes tipos de estrés está asociada a las respuestas oxidativas y antioxidativas de las plantas, por ello el conocimiento y

manipulación de señales de estrés, para incrementar la tolerancia y resistencia de variedades de papa de interés, ante estrés biótico y abiótico, permitiría reducir el empleo de agroquímicos, los costos y riesgos al medio ambiente, al utilizar compuestos ecológicamente inocuos.

Existen evidencias de que moléculas involucradas en las respuestas oxidativas participan en la tolerancia a estrés. Así, compuestos como el ácido abscísico (ABA) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) actúan directamente en la tolerancia a estrés a bajas temperaturas a través de la inducción del sistema antioxidante de las plantas. Estos compuestos además, son de bajo costo y no presentan ningún riesgo al ambiente.

Asimismo, se tiene documentado que el ABA y el H_2O_2 inducen incrementos en los niveles de antioxidantes en las respuestas de tolerancia. De ahí, que el objetivo principal de este trabajo fue investigar si, la inducción de tolerancia a baja temperatura inducida por ABA en microplantas de papa, estaba relacionada al estrés oxidativo y a las respuestas antioxidantes.

En este trabajo la planta de la papa se estudia como modelo para estudios de estrés oxidativo, así como, algunos mecanismos involucrados en la regulación del sistema antioxidante que llevan a la tolerancia a baja temperatura.

1.1 OBJETIVOS

Objetivos Generales.

1. Determinar si los sistemas oxidativo y antioxidativo están involucrados en la tolerancia a estrés por baja temperatura en *S. tuberosum*.
2. Conocer el efecto del ácido abscísico (ABA) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la inducción de tolerancia a estrés a baja temperatura.
3. Establecer si las respuestas a baja temperatura mediadas por ABA y H_2O_2 en microplantas de papa, están asociadas al estrés oxidativo y a las respuestas antioxidantes.

Objetivos específicos.

1. Estudiar la actividad enzimática de CAT, APX, POX y AO en respuesta a estrés a baja temperatura en microplantas de *S. tuberosum* tratadas con ABA o H_2O_2 .
2. Estudiar el contenido de H_2O_2 y ácido ascórbico en respuesta a estrés a baja temperatura en microplantas de *S. tuberosum* tratadas con ABA o H_2O_2 .
3. Evaluar el efecto del ABA a largo plazo en las microplantas de *S. tuberosum* en condiciones de *in vitro* e invernadero.

II. ANTECEDENTES

2.1. Origen e importancia del cultivo de la papa.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta de la familia Solanácea, su centro de origen está ubicado en Sudamérica a 4000 metros de altitud. Hay 200 especies silvestres en América que crecen desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile. El género está distribuido desde el nivel del mar hasta más de 4000 msnm (van der Schild, 1981; Espinoza, 1988). En Perú se encuentra el mayor número de especies silvestres de papa conocidas en el mundo (CIP, 1998). La parte central de México es el centro de origen de especies silvestres de papa con, que resistencia al tizón tardío, enfermedad principal del cultivo, provocada por el hongo *Phytophthora infestans* (Gallegly y Galindo, 1958). La papa se cultiva en casi todo el mundo siendo un cultivo importante en países con alta densidad demográfica como China e India (Espinoza, 1988; CIP, 1998) y ocupa el cuarto lugar entre los cultivos de importancia alimenticia y económica a nivel mundial (CIP, 1998; Rubio *et al.*, 2000).

En México el cultivo de la papa ocupa el sexto en importancia alimenticia, sin embargo, no es un alimento base, aunque en los últimos años su incremento en el consumo nacional y su valor comercial la convierte en un producto muy importante. Por su gran plasticidad, resistencia, alta productividad y características agronómicas, se cultiva extensivamente en 19 estados del país desde Baja California hasta Chiapas (SAGARPA INIFAP, 1997).

La papa contribuye a la alimentación humana como fuente de carbohidratos, y también de proteínas, vitaminas y minerales. La papa tiene mayor valor nutricional por unidad de superficie cosechada que otros cultivos (Wolf, 1987). La papa sirve de materia prima en la industria de la transformación en fresco a partir del almidón llamado también fécula; éste se emplea tal cual o despolimerizado como dextrina (almidón modificado), en varias industrias alimenticias: como sustituto de la harina para aligerar las pastas en la fabricación de galletas y repostería; como espesante y estabilizante en los helados, sopas y salsas; en alcoholes como el vodka o el aquavit. En la industria farmacéutica la fécula se utiliza como excipiente para los comprimidos (Ducreux *et al.*, 1986).

En México la papa se industrializa en forma de hojuela para botana “papas fritas”, lo cual representa el 95% del total procesado en el país. La papa también se procesa de manera congelada para fritura a la francesa (Gallardo, 2006). Otros usos de la papa son: cerámica, macetas, papel, cartón, entre muchos otros (SICA, 2000).

La capacidad de respuesta de la papa a condiciones de cultivo *in vitro* ha permitido la implementación de esta tecnología en la industria y la agricultura, mejorando la calidad y la productividad de este cultivo. El cultivo de tejidos en papa comprende distintas áreas de aplicación como: eliminación de virus (Sánchez *et al.*, 1991; López-Delgado *et al.*, 2004), conservación de germoplasma (Roca *et al.*, 1989; López-Delgado *et al.*, 1998b), producción de tubérculos *in vitro* (Koda *et al.*, 1991; López-Delgado y Scott, 1996), organogénesis (Mora, 1991; Lopez-Delgado y Carrillo-Castañeda, 1996), exportación de germoplasma internacional, variación somaclonal, transformación y micropropagación (Espinoza *et al.*, 1986). Algunas de estas tecnologías han sido implementadas en esquemas de producción de semilla en México en el ámbito privado y público en Universidades e Institutos de Investigación (López *et al.*, 1985).

2.1.1. Reproducción del cultivo de la papa.

La reproducción de *S. tuberosum* se lleva a cabo de manera sexual y asexual. La reproducción sexual se da por semilla obtenida de frutos (semilla botánica), esta reproducción es importante, ya que es una especie con diferentes niveles de ploidía, los cuales inclusive se usan para clasificarlas (Ligarreto, 2001). En la reproducción sexual participan los órganos reproductivos femeninos (pistilos) y masculinos (anteras) de las flores, en las que tiene lugar la unión del material genético de los progenitores, que originan plantas con nuevas combinaciones de genes. En algunos países andinos de América la semilla botánica es usada como fuente de producción de papas (Golmirzaie y Mendoza, 1988), lo que ofrece ventajas para los agricultores de escasos recursos, ya que es más económica, resiste a enfermedades por la variabilidad genética y es fácil de transportar. Sin embargo, por su alta variabilidad genética y por ser considerada semilla de baja calidad por no tener las características requeridas para consumo e industria, la semilla botánica es empleada

sólo en países en desarrollo que no pueden adquirir semilla certificada (Golmirzaie y Mendoza, 1988).

La reproducción o propagación asexual de la papa es por medio de la semilla agronómica o tubérculo. En esta forma de propagación no existe variabilidad genética, ya que el origen de esta estructura es mitótico (somático). La principal característica de este tipo de reproducción es que la nueva planta posee únicamente la combinación de genes del individuo de donde proviene la estructura de propagación. Esta forma de reproducción da lugar a descendientes genéticamente idénticos a la planta progenitora que generalmente posee las características agronómicas seleccionadas para la resistencia a enfermedades y calidad en el tubérculo para el consumo humano o industrial (Golmirzaie *et al.*, 1990).

El método actual de producción de semilla-tubérculo involucra las etapas de: *in vitro*, invernadero y campo, lo cual permite la obtención de semilla de calidad fitosanitaria apta para la siembra (Mora y López, 2006). En el cultivo de la papa también se emplean los minitubérculos, los cuales se obtienen de plantas cultivadas en invernadero, o microtubérculos provenientes de microplantas, que tienen las mismas características que un tubérculo más un estricto control de calidad y sanidad (FONAIAP, 1995). El cultivo de tejidos de la papa se emplea con diferentes fines, entre ellos destacan:

Obtención de plantas libres de virus. Estos patógenos reducen el rendimiento y la calidad de los tubérculos. Los métodos más usuales para liberar materiales infectados de uno o más virus son: el cultivo de meristemas y la termoterapia o quimioterapia o la combinación de ambas (Quak, 1972, citado por López *et al.*, 1985).

Propagación vegetativa de material sano. Una vez que el material está libre de virus se propaga y se obtiene semilla tubérculo.

Mantenimiento de bancos de germoplasma in vitro. Debido a que la semilla de papa (botánica) es de tipo recalcitrante (no permite reducir el contenido de humedad para ser conservada en condiciones ambientales por mucho tiempo), aún en contenidos altos de humedad, duran pocas semanas o meses, lo que obliga a utilizar la semilla antes de que pierda su viabilidad. La semilla botánica no se utiliza para la

propagación principalmente porque es altamente heterocigótica y presenta varios grados de esterilidad, por lo que la semilla agronómica debe conservarse de forma vegetativa. El mantenimiento de un banco de germoplasma *in vitro*, permite conservar en espacio reducido, gran cantidad de materiales con menor riesgo de pérdidas por almacenamiento. En el caso de la papa, Espinoza *et al.* (1984), reportaron que es posible mantener material *in vitro* en condiciones de baja luminosidad y temperatura e induciendo estrés osmótico por medio de manitol o sacarosa o por inhibidores del crecimiento (Roca *et al.*, 1982) efectuando una transferencia cada dos o tres años a un medio de cultivo nuevo.

Tuberización in vitro. Se obtienen tubérculos *in vitro* libres de patógenos, los que se almacenan por algunos meses, sin necesidad de hacer subcultivos, lo cual permite prolongar el tiempo de almacenamiento, además, son transferibles fácilmente (López *et al.*, 1985).

2.1.2. Problemas en el cultivo de la papa.

Muchos cultivos de importancia económica y alimenticia, son atacados por enfermedades y condiciones ambientales adversas (Scott *et al.*, 1999). Las plantas propagadas por semilla botánica tienen dentro de su acervo genético, información que las lleva a ser más tolerantes a los patógenos y a las condiciones ambientales adversas (Golmirzaie *et al.*, 1990), sin embargo, muchas veces, no tienen la calidad ni el rendimiento requerido para las necesidades alimentarias de los pueblos, de ahí la importancia del mejoramiento genético para obtener variedades con las características deseables como alimento y para la industria (Golmirzaie *et al.*, 1990). Las variedades obtenidas por mejoramiento genético, sólo pueden perpetuarse a través de la propagación asexual. Es muy importante hacer hincapié que todas las características esperadas en un cultivo se obtienen de la variabilidad genética encontrada en las especies silvestres (Wiersema, 1986; Golmirzaie *et al.*, 1990).

En el último censo nacional, la superficie sembrada con papa fue de 62,635 hectáreas con un rendimiento medio de 20.6 toneladas por hectárea. Aunque, hay estados de la república que producen 13.8 ton/ha (Gallardo, 2006). Entre los factores que ocasionan bajos rendimientos se encuentran; la falta de semilla sana,

topografía accidentada, clima propicio para el desarrollo de enfermedades (principalmente tizón tardío) y un bajo nivel económico y tecnológico de los productores. El 64% de la superficie se siembra con variedades extranjeras introducidas, entre las que destacan; Alpha, Atlantic, Mondial y Gigant, entre las variedades Mexicanas se siembran Rosita, Marciana, Malinche, Norteña, Tollocan y San José en el 36% de la superficie (Gallardo, 2006).

Las enfermedades más importantes del cultivo de la papa son: Roña polvorienta (*Spongospora subterranea*), Mancha foliar (*Cercospora* spp.), Pierna negra (*Erwinia* spp.), Marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*), Tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont De Bary), Tizón temprano (*Alternaria solani*, Ellis y Martin), Complejo Punta morada de la papa, provocado por fitoplasmas y/o psílicos (*Paratrioza cockerelli*), Costa negra (*Rhizoctonia solani* K); y por virus como: el del enrollamiento de la hoja (virus PLRV), virus S de la papa (PVS), mosaico rugoso (virus PVY), y Mosaico latente X (PVX, Hooker, 1980). Estas enfermedades junto con los problemas ya mencionados incrementan los costos de producción y además causan una drástica contaminación ambiental por el uso excesivo de pesticidas para su control (Gallardo, 2006). Adicionalmente, existen factores ambientales adversos que afectan el rendimiento en los cultivos tales como; temperaturas extremas, disponibilidad de agua, intensidad de luz, contaminación, radiación ultravioleta, disponibilidad de nutrientes, salinidad (Foyer *et al.*, 1994a, 1997; Scott *et al.*, 1999; Bray *et al.*, 2000; Mora-Herrera *et al.*, 2005; Scandalios, 2005).

Tanto los factores bióticos como los abióticos llevan a un estado de estrés oxidativo al cultivo, que inclusive puede matar a la planta. Las respuestas involucradas en el estrés oxidativo pueden inducir tolerancia o aclimatación. El conocimiento de la señalización en la inducción de tolerancia en las respuestas de estrés, así como de las moléculas involucradas, puede ser utilizado en el manejo integrado del cultivo para inducir tolerancia de manera natural y disminuir el uso de agroquímicos en la producción de papa (Mora y López, 2006).

2.2. Estrés oxidativo.

Los factores bióticos y abióticos causan estrés oxidativo a través de la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como: oxígeno en estado singulete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), estas son producidas directa o indirectamente por diversas reacciones celulares y muchos compartimentos intracelulares están implicados en su generación (Scandalios, 2005).

Las ERO inhiben la función enzimática, dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de la célula. Cuando las plantas están expuestas a condiciones ambientales adversas, el daño oxidativo ocurre porque el balance entre la producción de ERO y su desintoxicación por el sistema antioxidante es alterado (Foyer *et al.*, 1994a; Hernández *et al.*, 1995; Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005). El incremento en la producción de derivados de oxígeno tóxico, es indicador de condiciones de estrés oxidativo, sin embargo, estas moléculas también son producidas por procesos metabólicos normales de la célula (Foyer *et al.*, 1994a; Scandalios, 2005).

2.2.1. Fuentes de producción de ERO.

El cambio de una atmósfera oxidante a reductora por el incremento de oxígeno molecular (O_2), dio ventajas a los organismos aeróbicos para la obtención de energía usando el O_2 como oxidante final en la respiración, a pesar de que la presencia de oxígeno en el ambiente celular es una amenaza oxidativa constante a la estructura y procesos celulares (Mallick y Mohn 2000; Scandalios, 2002, 2005; Foyer y Noctor, 2000, 2005), ya que se forman ERO que son formas parcialmente reducidas de O_2 . Las ERO resultan de la reducción de O_2 a forma de oxígeno en estado singulete ($^1\text{O}_2$) o de la transferencia de 1, 2 o 3 electrones a O_2 para formar, respectivamente, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radicales hidroxilo ($\cdot\text{HO}$, Foyer *et al.*, 1997; Mittler, 2002; Scandalios, 2005). Las principales fuentes de generación de ERO son: el cloroplasto, la mitocondria, la membrana plasmática, la pared celular, el peroxisoma, el retículo endoplásmico, y el espacio apoplástico (Foyer *et al.*, 1997; Bolwell, 1999; del Rio *et al.*, 2002; Mittler, 2002; Dat

et al., 2000; Blokhina *et al.*, 2003; Matamoros *et al.*, 2003; Apel y Hirt, 2004; Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005; Bhattacharjee, 2005).

Cloroplasto

Los cloroplastos son la fuente más importante de oxidantes en los tejidos de las plantas (Foyer *et al.*, 1994a). En el cloroplasto las ERO se forman, en el centro de reacción del fotosistema II (fotoinhibición), en el transporte de electrones pseudocíclico del fotosistema I y II (FSI, FSII) y en la fotorrespiración (Foyer *et al.*, 1994ab, 1997; Dat *et al.*, 2000; Van Breusegem *et al.*, 2001; Scandalios, 2005).

En la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis si el NADP^+ es limitado, la ferredoxina reduce el O_2 a O_2^- (Reacción de Mehler), entonces, el transporte de electrones es de forma pseudocíclica. Este transporte de electrones se da cuando los estomas permanecen cerrados por condiciones ambientales adversas (Esquema 1). El O_2^- generado es dismutado a H_2O_2 por la superóxido dismutasa (SOD), ambas ERO pueden formar radicales hidroxilo ($\cdot\text{HO}$) con la presencia de Fe^{2+} (Reacción de Fenton o Haber-Weiss) o bien, el H_2O_2 también puede entrar al ciclo del glutatión ascorbato para ser dismutado a H_2O (Esquema 1, Foyer *et al.*, 1994a, 1997; Bray *et al.*, 2000; Dat *et al.*, 2000; Foyer y Noctor, 2000).

La fotoinhibición de los fotosistemas genera $^1\text{O}_2$ al activar al oxígeno de la forma triplete ($^3\text{O}_2$, Foyer *et al.*, 1997; Dat *et al.*, 2000; Apel y Hirt, 2004).

La Fotorrespiración es una ruta metabólica ligada a la fotosíntesis, en la cual se produce H_2O_2 , en ella participan el cloroplasto, el peroxisoma y la mitocondria. La fijación del O_2 por la Rubisco forma dos fosfoglicolatos que son convertidos a glicolatos en el cloroplasto, estos son transportados a los peroxisomas donde son convertidos a glioxilato por la glicolato oxidasa, esta reacción genera H_2O_2 (Esquema 1. Foyer *et al.*, 1997; Bray *et al.*, 2000; Dat *et al.*, 2000; Blokhina *et al.*, 2003; Apel y Hirt, 2004).

Mitocondria

En la mitocondria se lleva a cabo la respiración, proceso de oxidación-reducción donde el O_2 es reducido para obtener ATP. Existen dos sitios principales de producción de O_2^- en el transporte de electrones de la respiración; en el complejo I NAD(P)H deshidrogenasa y en el complejo III por el citocromo bc_1 . El O_2^- producido

es transformado a H_2O_2 por la Mn superóxido dismutasa (MnSOD, Esquema 1). La contribución de ERO por la mitocondria es muy baja, debido a la presencia de la oxidasa alternativa (AOX) que cataliza la reducción tetravalente del O_2 por la ubiquinona; AOX compite con el citocromo bc1 por electrones y ayuda a reducir la producción de ERO en la mitocondria (Esquema 1, Foyer y Noctor, 2000; Apel y Hirt, 2004).

Peroxisomas

Los peroxisomas son organelos subcelulares con un metabolismo oxidante, donde se producen radicales O_2^- y H_2O_2 (Esquema 1). Bajo condiciones normales de metabolismo la producción de O_2^- no es peligrosa a la célula cuando es protegida contra estos radicales por el sistema antioxidante, sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés, puede incrementarse en el citosol produciendo estrés oxidativo (del Rio *et al.*, 1996). Los O_2^- tienen una vida media muy corta y son rápidamente convertidos a H_2O_2 el cual incrementa en condiciones de estrés (del Rio *et al.*, 1996). Las evidencias sugieren que una de las funciones de los peroxisomas es generar moléculas señalizadoras ya que producen e incrementan las ERO y el óxido nítrico (ON, del Rio *et al.*, 2002).

Los glioxisomas son peroxisomas especializados presentes en los tejidos de almacenamiento de las semillas que contienen ácidos grasos, en este tipo de peroxisomas se lleva a cabo la β -oxidación y el ciclo del glioxilato, ambos de los ácidos grasos. La β -oxidación convierte los triglicéridos de las reservas de la semilla en glucosa, la cual es fácilmente trasladada a la mitocondria para la obtención de energía, este proceso genera grandes cantidades de H_2O_2 mismas que son dismutadas a H_2O y O_2 por la CAT que es abundante durante el proceso de germinación y primeros estadios de la plántula para la prevención de un daño oxidativo (Esquema 1, Bray *et al.*, 2000; del Rio *et al.*, 2002).

Membrana plasmática

Al menos 8 tipos de reacciones oxidoreductoras han sido descritas en la membrana plasmática, las cuales involucran NAD(P)H, algunas reacciones están relacionadas con la regulación del crecimiento y otras con las respuestas de defensa de la interacción planta patógeno en las cuales se producen O_2^- y H_2O_2 (Esquema 1)

lo que se conoce como estallido oxidativo y lleva en última instancia a la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA, Medhy *et al.*, 1996).

Pared celular

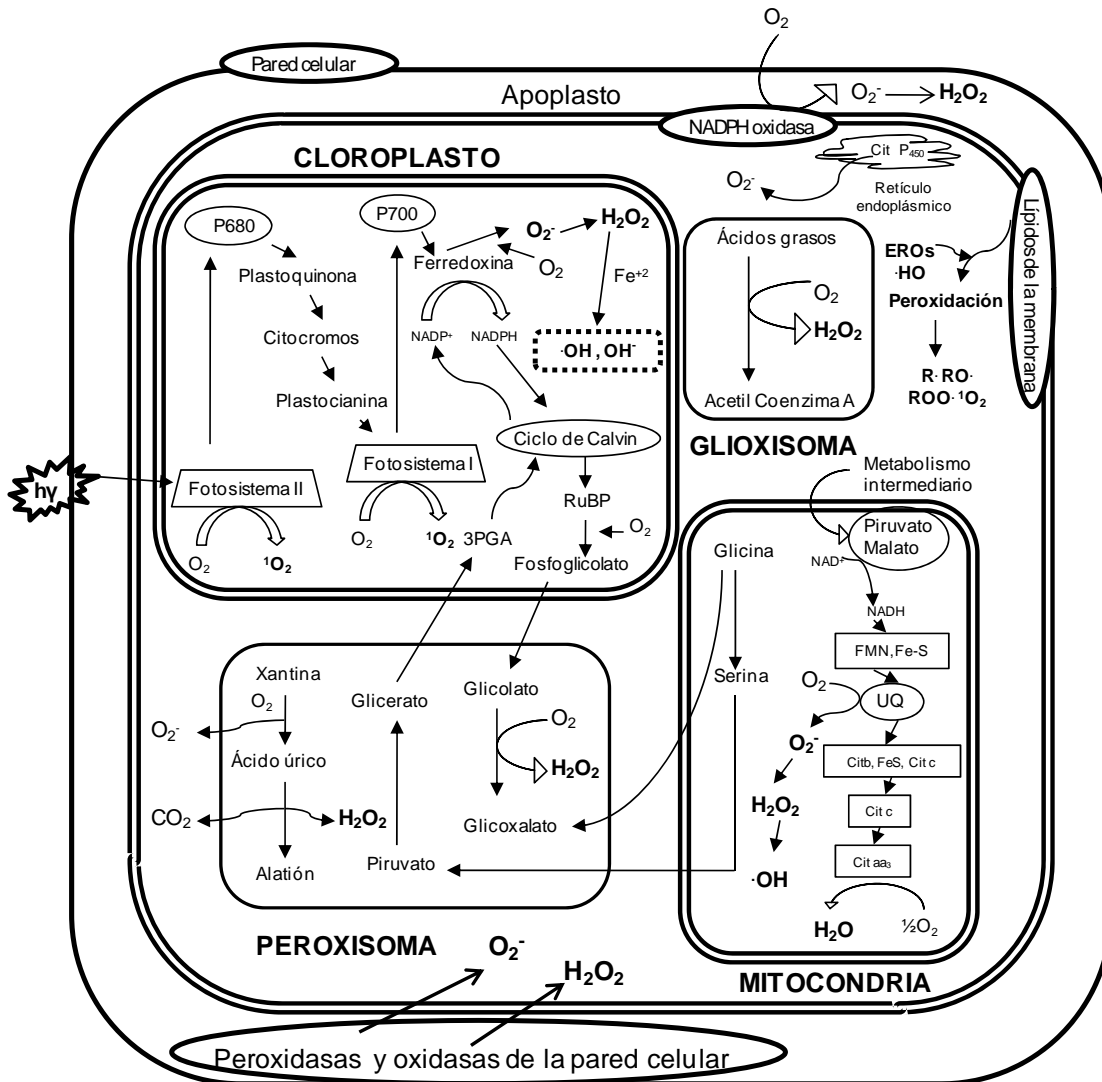
En la pared celular existen, oxidasas y peroxidasas que producen ERO, como parte del metabolismo para la lignificación, durante la xilogénesis, pero, otra función importante es su participación en el estallido oxidativo durante las respuestas de defensa ante condiciones ambientales adversas. Las peroxidasas producen O_2^- utilizando $NADH^+$ el cual es dismutado a H_2O_2 por la SOD (Esquema 1, Bolwell y Wojtaszek, 1997; Bhattacharjee, 2005).

Apoplasto

En el apoplasto se producen ERO en condiciones normales de metabolismo y en condiciones de estrés por la oxalato oxidasa que cataliza la conversión de oxalato a CO_2 y H_2O_2 (Bolwell y Wojtaszek, 1997) y la amino oxidasa que cataliza la oxidación de aminas a aldehído con incremento de NH_3 y H_2O_2 (Esquema 1, Blokhina *et al.*, 2003; Bhattacharjee, 2005).

Retículo endoplásmico

Otra fuente importante de ERO son las reacciones de desintoxicación catalizadas por el citocromo P_{450} en el citoplasma y retículo endoplásmico que principalmente generan O_2^- (Esquema 1, Bhattacharjee, 2005).



Esquema 1. Fuentes de origen de especies reactivas de oxígeno en la célula vegetal (tomada con modificaciones de Bhattacharjee, 2005).

2.2.2. Función de las ERO en las respuestas a factores de estrés.

Las ERO son destructivas a todos los componentes celulares, además, tienen una función importante como señales en la regulación de la expresión genética transcripcional y pos-transcripcional, así, las plantas responden a condiciones ambientales adversas y al ataque de organismos patógenos (Foyer *et al.*, 1994ab; Dat *et al.*, 2000; Foyer y Noctor, 2005) lo que puede llevar a la aclimatación y/o tolerancia cruzada en las plantas (Esquema 2, Foyer *et al.*, 1997; Neill *et al.*, 2002ab; Bhattacharjee, 2005).

Las plantas perciben, traducen y envían las señales de las ERO en respuestas celulares. Los mecanismos específicos por los cuales se dan todas las vías de señalización no se han entendido del todo. Las rutas de transcripción que responden a las ERO en eucariontes se tratan de describir actualmente (Esquema 2; Scandalios, 2005).

La transducción de señales requiere de un preciso balance redox para que las proteínas sensibles al sistema redox (PSSR) induzcan o repriman respuestas (Esquema 2). Existen dos mecanismos moleculares en la regulación del sistema redox para el funcionamiento de las proteínas en los organismos vivos: a través de la oxidación del grupo tiol de las proteínas, y por oxidación del grupo hierro-sulfuro (Fe-S) de las proteínas (Bhattacharjee, 2005).

En general el superóxido, que es altamente tóxico, no pasa a través de las membranas biológicas porque es rápidamente dismutado a H_2O_2 por la actividad de la superóxido dismutasa (SOD, Bhattacharjee, 2005). El H_2O_2 es el más estable de las ERO y puede difundirse a través de las membranas por los canales de agua o por canales especializados llamados peroxiporinas (Neill *et al.*, 2002b). Además de su vida media relativamente larga de 1 milisegundo que contribuye a su difusión a distancia desde su sitio de producción (Vranová *et al.*, 2002). El H_2O_2 forma radicales hidroxilo cuya vida media es muy corta, apenas de nanosegundos, y sólo puede reaccionar con otras ERO y biomoléculas próximas a donde se produjo, por lo que no se considera una señal de transducción (Mori y Schroeder, 2004).

Función del H_2O_2 en las plantas

El H_2O_2 es continuamente generado de varias fuentes, durante el metabolismo normal de las plantas (sección 2.2.1). Se encuentra en diferentes concentraciones en condiciones óptimas que van de 60 μ M-7mM en *Arabidopsis* a 1-2 mM en maíz y arroz (Jiang y Zhang, 2001) y sus niveles aumentan durante o en respuesta a estrés abiótico y biótico (Neill *et al.*, 2002b; Desikan *et al.*, 2004).

El H_2O_2 participa en funciones fisiológicas de las plantas, como entrecruzamiento de proteínas (Ros Barcelo, 1998) y es intermediario de respuestas como el cierre de estomas inducido por ABA (Pei *et al.*, 2000) y el gravitropismo de raíces regulado por auxinas (Joo *et al.*, 2001). También participa como señal en: la respuesta

hipersensitiva y en la resistencia sistémica adquirida (Levine *et al.*, 1994); en la muerte celular programada; en la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (León *et al.*, 1995), en la aclimatación y en la tolerancia cruzada (Levine *et al.*, 1994; Foyer *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2002a).

Por otro lado, se ha reportado que el H₂O₂ induce la expresión de genes tales como: los involucrados en su propia síntesis (Desikan *et al.*, 1998), los relacionados al sistema antioxidante (para evitar que incremente a niveles tóxicos), y los requeridos para la biogénesis de los peroxisomas que son necesarios para el control del H₂O₂ (Lopez-Huertas *et al.*, 2000).

Existen evidencias de que el H₂O₂ funciona como una señal de alarma en plantas mediante respuestas adaptativas a varios tipos de estrés (Desikan *et al.*, 2001, 2004), utilizando microarreglos de cDNA se identificaron 175 secuencias que son reguladas por H₂O₂, de éstas, 113 son inducidas y 62 son reprimidas, todas ellas con funciones en los procesos de defensa en células en suspensión de *Arabidopsis* (Desikan *et al.*, 2001). Mientras, que en *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró la síntesis de al menos 115 proteínas inducidas y 52 reprimidas por aplicación exógena de H₂O₂ (Godon *et al.*, 1998).

Otras respuestas a tratamientos de H₂O₂ incluyen: acumulación de proteínas de choque térmico como se encontró en células de tomate (Banzet *et al.*, 1998), incremento de proteínas intermediarias para la desintoxicación de ERO (Godon *et al.*, 1998), e inducción de los transcritos de glutatión S-transferasa (GST) en *S. commersonii* y *S. tuberosum* (Seppänen *et al.*, 2000). Así mismo, se encontró que el H₂O₂ producido durante la cicatrización en embriones y hojas de maíz, dispara la respuesta antioxidante (Guan y Scandalios, 2000).

Un aspecto importante del H₂O₂ es que altera la expresión de genes relacionados con el sistema enzimático antioxidante, acerca de esto, se ha encontrado que concentraciones bajas como 0.5 y 1 mM de H₂O₂ inhiben la expresión de *Cat1* y *Cat3*, mientras dosis altas como 150 mM inducen marcadamente a estos genes en menos tiempo, estos datos demuestran una acción directa de señalización del H₂O₂ en la regulación de la respuesta genética antioxidante en maíz (Polidoros y Scandalios, 1999). También se encontró que en tratamientos con H₂O₂, el gene

sodCp que codifica para Cu/Zn SOD fue inducido poco tiempo después del tratamiento (Kaminaka *et al.*, 1999), y un incremento de la actividad de la glutatión reductasa y de la CAT en genotipos sensibles de trigo (Sairam y Srivastava, 2000).

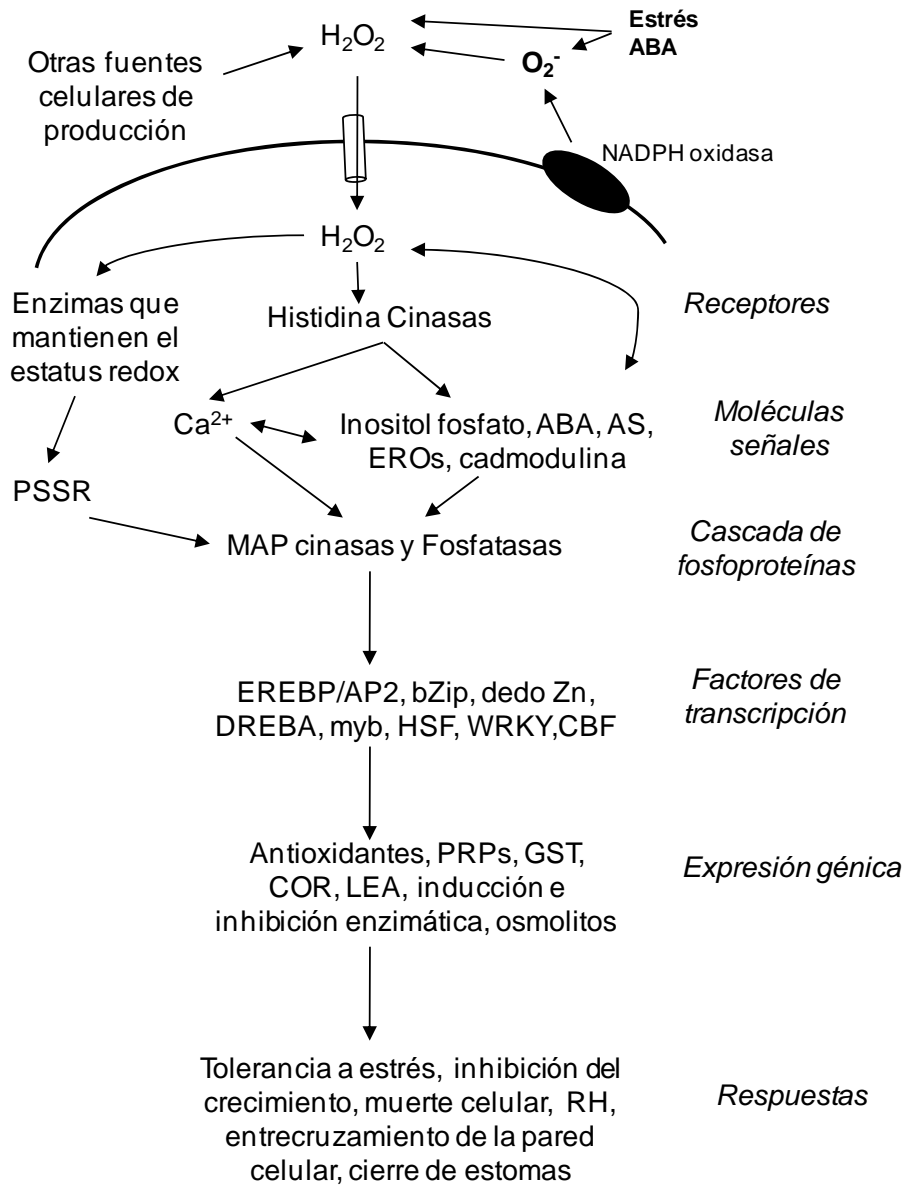
Función del H₂O₂ como señal

El flujo de calcio y la fosforilación reversible de proteínas son el principal componente de la transducción de señales en las células eucariontes y ambas requieren de la generación controlada de H₂O₂ (Neill *et al.*, 2002a). Además, el tratamiento de H₂O₂ activa los canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática de las células guarda (Pei *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2001) y puede afectar la movilización de Ca²⁺ (Esquema 2, Neill *et al.*, 2002ab).

El H₂O₂ también activa la cascada de las MAPK (proteínas tipo cinasas activadas por mitogeno) en varios tejidos vegetales aunque no se ha logrado dilucidar cómo es esta activación. La activación constitutiva de las MAPK en respuesta a H₂O₂ induce tolerancia cruzada a varios tipos de estrés ambientales (Esquema 2, Desikan *et al.*, 1999; Joo *et al.*, 2001).

La señalización en las células es considerada como una intrincada red de señales intercomunicadas más que redes paralelas separadas. Por ello se ha dificultado diferenciar las primeras respuestas celulares inducidas por H₂O₂, de esas que son afectadas vía otras señales intermediarias. Por lo tanto, se piensa que si el H₂O₂ es una verdadera una molécula señal, debe existir un blanco primario de H₂O₂. Químicamente el H₂O₂ es una molécula simple y probablemente existe un receptor específico del H₂O₂. El H₂O₂ es un oxidante leve que puede interactuar con residuos de cisteína dentro de la proteína, dependiendo del tipo de moléculas que se encuentren en el ambiente celular (Esquema 2, Neill *et al.*, 2002b). Esto puede inducir un cambio conformacional que altera la actividad de las proteínas y que son lo suficientemente duraderos para iniciar respuestas celulares. Hay muchas PP (proteínas fosfatasa) potenciales en plantas, algunas de las cuales también pueden ser susceptibles al H₂O₂ y disparadas por PPs, incluyendo las MAPK. Así, la activación de las MAPK puede ser debida a los efectos de H₂O₂ sobre las PP (Esquema 2, Neill *et al.*, 2002b).

Otras respuestas en las plantas son al menos parcialmente mediadas por el H_2O_2 , por ejemplo, la expresión genética de la catalasa inducida por ABA en células de maíz ocurre vía H_2O_2 (Guan *et al.*, 2000). El tratamiento con H_2O_2 en semillas de maíz tiene una función importante como intermediario en el funcionamiento del ABA en las vías de señales de transducción, llevando a la inducción del gen *Cat1* (Esquema 2, Guan *et al.*, 2000).



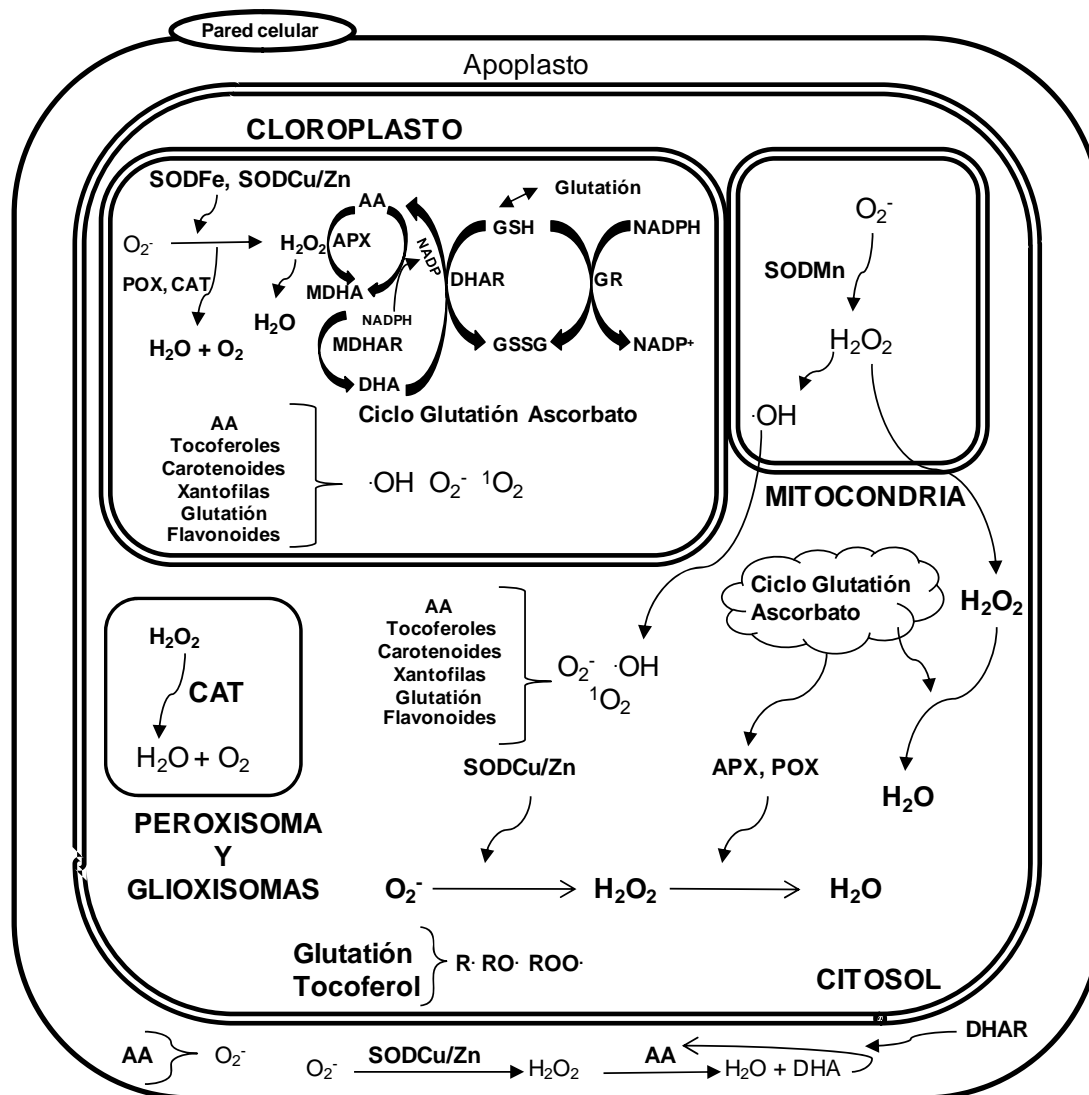
Esquema 2. Diagrama de la participación del H_2O_2 en las rutas de señalización en la expresión génica (tomado y modificado de Xiong *et al.*, 2002).

2.3. Mecanismos de defensa contra ERO.

Las ERO son altamente destructivas a las funciones y estructura celular, por ello, se requiere un sistema de defensa antioxidante que reduzca su daño (Foyer *et al.*, 1994a; Scandalios, 2005). Estudios en plantas transgénicas indican que la habilidad de las plantas para metabolizar las ERO depende de la coordinación del sistema antioxidante de protección, más que de la actividad de una sola enzima (Esquema 3, Dalal y Khanna-Chopra, 2001).

La capacidad de las plantas para compensar el incremento de estrés oxidativo, se limita por diferentes factores endógenos, como: sus antecedentes genéticos y factores exógenos, tales como: temperatura, luz y nutrimentos, entre otros, por lo tanto, una alta capacidad antioxidante confiere alta tolerancia a un amplio rango de diferentes tipos de estrés ambientales (Polle, 1997).

En los organismos aeróbicos el estrés aumenta el estado de oxidación de la célula, lo cual induce incremento en la síntesis de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Esquema 3). Los principales antioxidantes enzimáticos son: ascorbato peroxidasa, peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, dehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa, monodehidroascorbato reductasa y glutatión S-transferasa (Foyer *et al.*, 1994a; Mallick y Mohn, 2000; Scandalios, 2002, 2005). Los antioxidantes no enzimáticos más importantes son: ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión reducido (GHS), poliaminas (putrescina, espermina), β -carotenos y zeaxantina (Mallick y Mohn, 2000; Scandalios, 2002, 2005).



Esquema 3. Principales mecanismos de defensa antioxidante en la célula.

2.3.1. Antioxidantes Enzimáticos.

2.3.1.1. Superóxido dismutasa.

La primera línea de defensa contra las ERO en la célula son las superóxido dismutasas (SOD, EC 1.15.1.1; Bowler *et al.*, 1992; Polle, 1997; Alscher *et al.*, 2002), las cuales son un grupo de metaloenzimas que convierten al superóxido, que es muy reactivo, en H_2O_2 , y este es dismutado en el ciclo del glutatión-ascorbato (Halliwell-Asada, Esquema 3) o por la catalasa, protegiendo así a la célula del estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2001; Scandalios, 2005). Las SODs se encuentran en varios compartimentos de la célula y contienen Cu/Zn, Fe, o Mn como cofactores (Bowler *et*

al., 1992; Alscher *et al.*, 2002) por lo que se han clasificado en tres grupos; SOD Fierro (SODFe), SOD cobre-zinc (SODCu/Zn) y SOD manganeso (SODMn). SODFe está localizada en el cloroplasto, SODMn en las mitocondrias y peroxisomas y SODCu/Zn en el cloroplasto, citosol y posiblemente en el espacio extracelular (Alscher *et al.*, 2002; Scandalios, 2005).

Las SOD incrementan su actividad en respuesta a diferentes factores de estrés incluido el frío en algunas plantas (Bowler *et al.*, 1992).

2.3.1.2. Catalasas.

Las catalasas (CAT, H₂O₂: H₂O₂ oxidoreductasa EC 1.11.1.6) se localizan principalmente, aunque no exclusivamente, en peroxisomas, donde hay alta producción de H₂O₂. Aunque, la CAT tiene una Km alta para H₂O₂, puede actuar sobre la producción de H₂O₂ antes de que se difunda a otras partes de la célula. CAT es una enzima tetramérica con un grupo hemo común en todos los organismos aeróbicos. Por su amplia distribución, conservación en la evolución de los organismos y su rápida capacidad para degradar al H₂O₂, se cree que la CAT desempeña una función importante de regulación entre los organismos y su medio ambiente (Scandalios, 2005). La CAT es una de las enzimas catalíticas más activas de la naturaleza ya que descompone al H₂O₂ a una tasa muy rápida correspondiente a su centro catalítico de actividad de aproximadamente 10⁷ min⁻¹. Dependiendo de la concentración de H₂O₂, la CAT puede tener una función dual. A concentraciones bajas (<1µM) de H₂O₂, la CAT actúa peroxidativamente. A concentraciones altas de sustrato la CAT descompone al H₂O₂ rápidamente por medio de una reacción “catalítica” en la cual el H₂O₂ actúa tanto como aceptor y como donador de moléculas de hidrógeno: 2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂; de esta manera la CAT no es fácilmente saturable con el sustrato, por ello la actividad enzimática se incrementa linealmente sobre un amplio rango de concentración de H₂O₂, así mantiene controlada la concentración de H₂O₂ intracelular (Scandalios, 2005). La CAT es la única enzima que degrada al H₂O₂ sin reducir a ningún otro compuesto, de ahí que la CAT provee a la célula de un eficiente mecanismo para remover al H₂O₂, cuando

este es producido en altas concentraciones (Foyer y Noctor, 2005; Scandalios, 2005).

La CAT es regulada de acuerdo al ciclo circadiano, el cual tiene correlación con la fotorrespiración, lo que hace aun más importante a esta enzima en el control del estrés oxidativo ocasionado por el exceso de energía (McClung, 1997).

En plántulas *A. thaliana* se demostró que la luz induce *CAT2* que es una enzima mediada por el sistema dependiente de un fitocromo y es controlada adicionalmente por el ciclo circadiano. Los niveles más altos de RNAm de *CAT2* se encuentran después del inicio de la luz, pero el RNAm empieza a acumularse en la oscuridad, así la expresión de *CAT* parece efectuarse con anticipación, con lo cual la planta se previene con suficiente cantidad de *CAT* cuando inicia la luz y con ello la fotorrespiración. En varias especies de plantas se ha reportado este fenómeno como en *N. plumbaginifolia*, *A. thaliana* y *Z. maiz*, donde se encontró que dependiendo de las condiciones de luz se acumula *CAT* RNAm (Willekens *et al.*, 1995).

El análisis molecular de la expresión genética de las catalasas ha sido realizado principalmente en las dicotiledóneas, en plantas C3, como el algodón, *Nicotiana plumbaginifolia* y el frijol *Phaseolus vulgaris*, y en las plantas monocotiledóneas C4, como el maíz. Comparaciones entre las catalasas de dichas especies revelan algunas similitudes en la organización de su expresión génica, con lo cual pueden ser clasificadas (Cuadro 1, Willekens *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Clasificación de las catalasas basada en sus propiedades de expresión (Willekens *et al.*, 1995).

	Clase I	Clase II	Clase III
<i>Gossypium herbaceum</i> (algodón)	SU2		SU1
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (tabaco)	Cat1	Cat2	Cat3
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)		CAT2	CAT1
<i>Zea maiz</i> (maíz)	CAT-2	CAT-3	CAT-1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT2		
<i>Lycopersicum esculentum</i> (jitomate)		TOMCAT1	
<i>Solanum tuberosum</i> (papa)		Cat2St	

Esta clasificación ayuda a la designación específica de las isoenzimas de catalasa (Cuadro 1). La clase 1, está caracterizada por tener una alta expresión en hojas. Esta expresión es dependiente de luz y es más frecuente en células fotosintéticas, esto indica que la clase I es la más importante en remover el H_2O_2 producido durante la fotorrespiración. Además tienen otras funciones, porque su expresión no es exclusiva de los tejidos verdes (Willekens *et al.*, 1995).

Las catalasas clase II, se expresan en semillas en presencia de luz de acuerdo al ritmo circadiano; también se expresan en plantas maduras en los tejidos vasculares; se encuentran en mitocondrias sin ser una característica general y aunque la función de estas catalasas no es muy clara, aunque su rápida inducción por ozono, SO_2 y UV-B sugiere que son importantes en protección contra factores de estrés ambiental (Willekens *et al.*, 1995).

Las catalasas clase III, son abundantes en semillas y plántulas jóvenes, pero están casi ausentes en estadios tardíos del desarrollo, no obstante, pueden aparecer durante la senescencia. La principal función de estas CAT es remover el H_2O_2 , que es producido durante la degradación de ácidos grasos en los glioxisomas (Willekens *et al.*, 1995).

A pesar, de la importante función de las catalasas en el control del H_2O_2 dentro de la célula, poco se sabe de sus funciones durante las condiciones de estrés, debido a su localización en el peroxisoma y por su extremada sensibilidad a la luz, temperaturas extremas, ozono, SO_2 , y ataque por patógenos (Willekens *et al.*, 1994). Pérdidas significativas en la actividad de la catalasa ocurren como resultado de bajas temperaturas (Fadzillah *et al.*, 1996). Inclusive, la actividad de la catalasa está sujeta a la fotoinactivación en condiciones de alta intensidad de luz, por lo tanto, la actividad de la catalasa en la hoja disminuye en muchas condiciones de estrés, particularmente cuando el estrés se combina con una alta intensidad de luz (MacRae y Ferguson, 1985). La inhibición en la actividad catalasa, durante el estrés puede en parte, ser la causa de la acumulación de H_2O_2 para generar señales de respuesta de defensa (Feierabend *et al.*, 1992; Prasad, 1997; Willekens *et al.*, 1994,1995; López-Delgado *et al.*, 1998a).

La importancia en las respuestas de estrés de la catalasa, puede ser por su actividad antioxidante directa y por su participación en mantener los niveles de H_2O_2 , el cual en su momento puede actuar como mensajero (Willekens *et al.*, 1994; Neill *et al.*, 2002ab).

2.3.1.3. Peroxidasas.

En las plantas, las peroxidasas se encuentran principalmente en: citoplasma, pared celular, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, cloroplastos y vacuolas Su distribución está asociada a diferentes funciones fisiológicas (Sgherri *et al.*, 2001), tales como: abscisión de flores y hojas, senescencia, dominancia apical, dormancia, desarrollo de frutos, germinación y desarrollo, respuesta de resistencia a patógenos, y tolerancia al frío (Gaspar y Greppin, 1982, citado por Mehlhorn *et al.*, 1996).

Las peroxidasas convierten al H_2O_2 en H_2O con la ayuda de un sustrato específico ($RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$) el cual se utiliza para clasificarlas. Las principales peroxidasas dependiendo del sustrato que utilizan como donador de electrones son: la glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX) y la guaiacol peroxidasa (POX, Mehlhorn *et al.*, 1996).

La **glutatión peroxidasa** (GPX, E.C. 1.11.1.9) contiene selenio y es primordial para remover el H_2O_2 en el citosol y mitocondrias de mamíferos. En las plantas la actividad de la glutatión peroxidasa ha sido encontrada sólo en pocos casos (Willekens *et al.*, 1995; Foyer *et al.*, 1997).

La **guaiacol peroxidasa** (POX, EC 1.11.1.7) forma una gran familia de peroxidasas que tienen poca especificidad de sustrato; éstas son conocidas por funcionar en diferentes reacciones peroxidativas en la célula, remueven al H_2O_2 y se encuentran en vacuolas, apoplasto, citosol y pared celular (Asada, 1992; Shigeoka *et al.*, 2002). La reducción de H_2O_2 por estas peroxidasas es a través de una serie de donadores de hidrógeno entre ellos los compuestos fenólicos, sin embargo, la función específica de estas isoenzimas y su regulación diferencial permanecen aún desconocidas (Mehlhorn *et al.*, 1996).

La **ascorbato peroxidasa** (APX, EC 1.11.1.11) utiliza ascorbato (ácido ascórbico, AA) como donador específico de electrones para reducir al H_2O_2 . En esta reacción el

AA es oxidado a monodehydroascorbato (MDHA), este es espontáneamente transformado a AA y dehidroascorbato (DHA). El MDHA es también reducido directamente a AA por la acción de la MDHA reductasa (dependiente de la NAD(P)H). La DHA reductasa utiliza al glutatión (GSH) para reducir al DHA a AA. Así, el APX en combinación con el ciclo glutatión-ascorbato (Halliwell-Asada) previene la acumulación de altos niveles tóxicos de H_2O_2 en organismos fotosintéticos (Esquema 3, Asada, 1992; Shigeoka *et al.*, 2002). Las isoenzimas de la APX están distribuidas en: el estroma (APXe), la membrana del tilacoide (APXt); el cloroplasto, el peroxisoma (APXm), el citosol (APXc; Yamaguchi *et al.*, 1995); y la membrana de la mitocondria (APXmi, Jiménez *et al.*, 1997).

La actividad de APX generalmente se incrementa con la actividad de otros antioxidantes enzimáticos como la CAT, SOD y la glutatión reductasa en respuesta a varios factores de estrés, esto sugiere que los componentes para desintoxicar las ERO forman un sistema que está co-regulado. Se ha encontrado que el incremento de la actividad enzimática de las peroxidasas y otras enzimas está asociado a la aclimatación a frío en plántulas de maíz (Prasad *et al.*, 1994b; Anderson *et al.*, 1995), en algodón (Payton *et al.*, 2001) y en radículas de plántulas de pepino (Kang y Saltveit, 2002); y en papa la actividad enzimática de la APX es inducida por baja temperatura, durante el almacenamiento de los tubérculos (Kawakami *et al.*, 2002) y la dormancia de la papa (Rojas-Beltran *et al.*, 2000).

2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos son pequeñas moléculas que, pueden ser compuestos hidrofílicos como el ascorbato y el glutatión y los antioxidantes lipofílicos como: el α -tocoferol y los carotenoides, que son componentes de organismos fotosintéticos. Compuestos fenólicos y flavonoides también descomponen o atrapan moléculas como 1O_2 , O_2^- y $\cdot OH$ (Esquema 3). Otras moléculas más complejas como el ácido fítico, fitoferritina y fitoquelatinas, forman complejos con metales para prevenir la producción de radicales libres en la reacción Haber-Weiss catalizada por Fe. En esta reacción el aumento de Fe^{3+} es reducido por O_2^- para producir Fe^{2+} el

cual de manera subsecuente reacciona con H_2O_2 para formar OH^- (Esquema 1, Foyer *et al.*, 1994b).

El glutatión es un metabolito esencial de las plantas, que regula algunas funciones celulares y además participa en la defensa antioxidante. El control del estado redox en diferentes compartimentos celulares, es esencial para la integridad de la estructura de la célula y para la apropiada función de varias rutas metabólicas, el glutatión y la glutatión reductasa participan en esta regulación redox, como componentes del ciclo del glutatión-ascorbato (Esquema 3, Foyer *et al.*, 1994a, 1997; Kocsy *et al.*, 2001). Este ciclo está presente en el citoplasma, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Jiménez *et al.*, 1997). Bajo condiciones óptimas, más del 90% del total del glutatión reducido (GSH) y de esta manera prevé la formación de puentes disulfuro intermoleculares, así, asegura la correcta construcción y apropiada actividad de las proteínas. El GSH es mantenido por la glutatión reductasa la cual regenera GSH de GSSG usando NADPH como agente reductor (Esquema 3; Foyer *et al.*, 1994b). Bajo condiciones de estrés como frío y aclimatación a frío, la relación de GSH y GSSG decrece, porque el GSH es usado para la reducción del exceso de H_2O_2 en el ciclo glutatión-ascorbato (Foyer y Halliwell, 1976; Foyer y Lelandais, 1993; Foyer *et al.*, 1994ab, 1997).

Los tocoferoles (vitamina E) son un grupo de moléculas relacionadas a los lípidos, las cuales tienen un grupo aromático. El tocoferol reacciona y destruye las ERO protegiendo a los ácidos grasos insaturados de la oxidación. El α -tocoferol es el más importante de los tocoferoles porque desactiva al $^1\text{O}_2$ reduciéndolo a O_2^- y evita que continúe la peroxidación de los lípidos. Los carotenoides están organizados en el complejo proteico de las membranas del tilacoide, donde funcionan para capturar y proteger del exceso de luz, disipando la energía y removiendo al $^1\text{O}_2$ (Esquema 3, Mallick y Mohn, 2000).

2.3.2.1. Ácido ascórbico.

El ácido ascórbico o ascorbato (AA) está presente en: cloroplastos, citosol, vacuolas y espacio apoplástico. En las células de las hojas, el 90% del AA está localizado en el citoplasma, pero a diferencia de otros antioxidantes una proporción

importante es exportada hacia el apoplasto, donde está presente en concentraciones milimolares. El AA es quizá, el antioxidante no enzimático más importante en las plantas, que participa en la defensa contra el estrés oxidativo tanto biótico como abiótico, por su función en la degradación del H₂O₂ vía el ciclo del glutatióncorbatato (Foyer *et al.*, 1983; Foyer y Lelandais, 1993; Foyer y Noctor, 2000; Smirnoff, 2000).

El AA también participa en muchos procesos fisiológicos tales como: fotosíntesis, cofactor enzimático, homeostasis del sistema redox (Smirnoff y Wheeler, 2000) y como precursor en las rutas de síntesis de moléculas del metabolismo primario y secundario (Noctor y Foyer, 1998). El AA también está involucrado en el crecimiento, desarrollo y modulación del ciclo celular y/o división celular (de Pinto y De Gara, 2004) así como en la elongación celular (Kato y Esaka, 1999).

Se ha propuesto que el AA del apoplasto es la primera defensa contra el daño potencial de oxidantes externos como el ozono, SO₂ y NO₂ (Barnes *et al.*, 2002). En el apoplasto el AA es oxidado a monodehidroascorbato (MDHA) por la enzima ascorbato oxidasa (AO), el MDHA es un radical altamente inestable que rápidamente se convierte en dehidroascorbato (DHA) y AA, el DHA es entonces transportado al citosol a través de la membrana plasmática por acarreadores específicos, los cuales de preferencia translocan la forma oxidada por un intercambio de la forma reducida, esto asegura un flujo continuo de poder reductor en la pared celular (Horemans *et al.*, 2000). No es clara la función biológica de la AO, sin embargo, se cree que participa en la elongación celular por su localización extracelular y su alta actividad en tejidos en expansión (Kato y Esaka, 1999). Estudios recientes en plantas de tabaco que sobre expresan AO, mostraron tener una elongación mas rápida que la forma silvestre (Kato y Esaka, 2000). Se piensa que algunos mecanismos por los cuales el AO controla el crecimiento celular están relacionados con el MDHA generado por AA y AO en el apoplasto el cual estimula el crecimiento celular a través del incremento del volumen de la vacuola (Hidalgo *et al.*, 1989) y la absorción de iones causada por la despolarización de la membrana plasmática, además, al DHA se le considera responsable del alargamiento celular por permitir el reacomodo de la pared celular. Así el AA ha sido propuesto como el antioxidante más importante

en el apoplasto de hojas y tallos, y su oxidación vía AO puede ser importante en facilitar la expansión celular (Pignocchi *et al.*, 2003, 2006). Además, existen evidencias de que el AA modula grupos de genes involucrados en la respuesta de defensa en *Arabidopsis* (Pignocchi *et al.*, 2003).

2.4. Factores bióticos y abióticos en el estrés oxidativo.

El ambiente cambia continuamente afectando a todos los organismos vivos, los cuales deben adaptarse para poder sobrevivir. Un organismo aparentemente bien adaptado a su ambiente, modifica su fisiología o desarrolla una respuesta a los cambios ambientales o condiciones metabólicas en corto tiempo. Los organismos que pueden ajustarse (por respuestas del genoma) a los cambios en el ambiente son los que muestran mayor grado adaptativo. El cómo, el genoma percibe y transduce las señales bióticas y abióticas del ambiente para expresar o reprimir determinado gen, todavía no es del todo claro (Scandalios, 2002, 2005).

Factores bióticos (respuesta a patógenos)

Cuando las plantas son atacadas por elicitores como; virus, hongos y proteínas de bacterias entre otros se produce una respuesta llamada estallido oxidativo, en la cual hay una rápida y excesiva producción de ERO, especialmente de superóxido (Foyer *et al.*, 1994a; Mehdy *et al.*, 1996). Esta respuesta es uno de los primeros eventos de la respuesta de hipersensibilidad (RH; Levine *et al.*, 1994).

La RH de las plantas se manifiesta por la delimitación y muerte de la zona vegetal donde invade el patógeno, lo que evita su invasión extensiva. Esta muerte local de las células forma una zona necrótica visible en el área infectada originada por las ERO del estallido oxidativo. Puede existir un segundo estallido oxidativo el cual tiene la función de inducir resistencia y tolerancia a través de la inducción de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP; Levine *et al.*, 1994; Mehdy *et al.* 1996). Así, las ERO tienen una doble función en el ataque por patógenos; primero lo delimitan y después inducen la respuesta sistémica adquirida (RSA; Mehdy *et al.* 1996). Se ha sugerido que el H₂O₂ del estallido oxidativo, puede intervenir en la resistencia cruzada (resistencia a cualquier patógeno, inclusive estrés abiótico), en la muerte programada de la célula y como señal difusible para la inducción de genes de

defensa (Levine *et al.*, 1994), tales como inducción del sistema antioxidante (Hernández *et al.*, 2001).

Factores abióticos

El estrés oxidativo puede ser originado por factores abióticos tales como; luz, radiación ultravioleta, sequía, salinidad, metales pesados, y temperaturas extremas y anoxia, entre otros (Foyer *et al.*, 1994a; Scott *et al.*, 1999; Scandalios, 2002).

Luz

La destrucción de la capa de ozono (O₃), principalmente debida a los clorhidratos fluorocarbonados y óxidos de nitrógeno, ha llevado al incremento de radiación ultravioleta UV, la cual afecta a los organismos; en las plantas se daña al fotosistema II, los ácidos nucleicos, enzimas, pigmentos y reguladores del crecimiento (Foyer *et al.* 1994b; Barabás *et al.*, 1997).

Agua

El principal factor limitante de la productividad en los cultivos es la falta de agua, lo que lleva a la sequía y salinidad en los suelos. El incremento del estrés por salinidad genera ERO que inhiben el crecimiento de las plantas. La tolerancia a la salinidad se da por una alta eficiencia en el sistema antioxidante, donde las ERO son importantes señales para la inducción de este sistema (Lee *et al.*, 2001).

Oxígeno

Muchos cultivos están expuestos a hipoxia o anoxia (falta parcial o total de oxígeno, que puede ser una consecuencia de la inundación o inmersión en agua de las plantas; Gibbs y Greenway, 2003), la cual da como resultado un incremento en las ERO, principalmente H₂O₂. La anoxia lleva a cambios en el contenido y composición de los lípidos de las membranas, así como también, cambia la acidez del citoplasma y los patrones de la síntesis de proteínas (Blokina *et al.*, 2001).

2.4.1. Estrés por bajas temperaturas.

Las bajas temperaturas causan pérdidas en la productividad y limitan la localización geográfica de los cultivos (Thomashow, 1998). Las bajas temperaturas están definidas principalmente en dos categorías: congelamiento y frío, por definición las temperaturas de congelamiento son aquellas en las que se forman

cristales de hielo en los espacios extra e intracelulares (Thomashow, 1998; Pearce, 2001), en contraste, el frío es una temperatura subóptima en la cual no se forman cristales de hielo, y ocurre abajo de 15°C (entre 0 y 15°C), aunque depende de la sensibilidad del cultivo (Kocsy *et al.*, 2001).

Las bajas temperaturas inducen alteraciones fisiológicas en los componentes celulares, entre otros: daño a los lípidos de las membranas (Murata y Los, 1997), incremento del flujo electrolítico (Gong *et al.*, 2001; Kang y Saltveit, 2002), cambio en el potencial osmótico (Bray *et al.*, 2000), deshidratación, incremento de ABA (Thomashow, 1998), y de ERO (Sato *et al.*, 2001; Kocsy *et al.*, 2001).

En las temperaturas de congelamiento, el daño principal es la severa deshidratación celular (Bray *et al.*, 2000). Así, cuando se forma hielo intracelular, hay un decremento en el potencial hídrico a través de la célula. Los efectos del daño celular son: desnaturalización de proteínas, precipitación de varias moléculas y lesión o lisis de las membranas (Thomashow, 1998; Pearce, 2001). Algunas plantas tolerantes al congelamiento mantienen su potencial hídrico cerrando sus estomas y previniendo la transpiración (Wilkinson *et al.*, 2001), o bien, promoviendo la formación de hielo extracelular, lo cual previene la formación de cristales de hielo en el citoplasma, donde ocasiona más daño, y también se inducen diferentes mecanismos como: la acumulación de osmolitos y proteínas de anticongelamiento en el apoplasto, o se forman muy lentamente los cristales de hielo, lo que puede retardar la deshidratación (Thomashow, 1998; Bray *et al.*, 2000).

Los mecanismos responsables de la tolerancia a bajas temperaturas no están del todo esclarecidos (Thomashow, 1998), sin embargo, la tolerancia a bajas temperaturas involucra cambios en la expresión genética, algunos de los genes inducidos por bajas temperaturas son también inducidos sólo por déficit de agua o por ácido abscísico. Las principales proteínas inducidas que incrementan la tolerancia al frío son; las AFP (proteínas de anticongelamiento), COR (regulación de frío), CRT/DRE (Elementos que responden a la deshidratación) y LEAs (proteínas abundantes en la embriogénesis tardía; Thomashow, 1998).

El estrés por la exposición a bajas temperaturas ha sido muy estudiado. Hay evidencias directas de la acumulación de ERO durante este estrés en: pepino

(Omram, 1980, citado por Dat *et al.*, 2000), plántulas de maíz (Prasad *et al.*, 1994a), tejido de callo de *Arabidopsis* (O'Kane *et al.*, 1996), arroz (Fadzillah *et al.*, 1996) y papa (Mora-Herrera *et al.*, 2005; López-Delgado *et al.*, 2007) entre otros. Las bajas temperaturas alteran la permeabilidad de la membrana de todos los organelos y originan cambios en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte iónico, permeabilidad electrolítica (Szalai *et al.*, 1996); asimilación de CO₂ asociado al flujo de electrones hacia el O₂ (Fryer *et al.*, 1998) y sistema redox de la célula (Kocsy *et al.*, 2001). Además, las ERO inducen fotoinhibición en híbridos de maíz sensibles a frío (Hodges *et al.*, 1997) y dañan las xantofilas en hojas de maíz (Leipner *et al.*, 2000). El incremento de las ERO puede tomar tres caminos; la inducción de un sistema antioxidante que ayude a contrarrestar los efectos de las ERO sobre los componentes celulares; inducción de genes relacionados con tolerancia o finalmente llevar a la muerte celular por exceso de las ERO (Dat *et al.*, 2000; Scandalios, 2002, 2005).

La alteración del sistema redox por las ERO activa los mecanismos de defensa de la célula, se ha demostrado que algunos genes de defensa antioxidante responden a cambios redox (Kocsy *et al.*, 2001).

Por otro lado, la combinación de factores abióticos como baja temperatura y baja intensidad de luz llevan a la disminución de la actividad enzimática antioxidante, como se encontró en el centeno, donde la actividad de la catalasa, peroxidasa y glutatión reductasa disminuyeron significativamente (Feierabend *et al.*, 1992), y en tallos de arroz expuestos a baja temperatura también se observó la disminución de la actividad de la catalasa y de la glutatión reductasa al igual que la actividad de las enzimas del ciclo del glutatión ascorbato se vieron alteradas (Fadzillah *et al.*, 1996). Lo cual coincide con lo reportado por Hodges *et al.* (1997), quienes encontraron que hay fotoinhibición a baja temperatura y que la relación de algunas enzimas antioxidantes como la catalasa y la ascorbato peroxidasa disminuyen en los híbridos de maíz sensibles a frío. Resultados similares, y efectos sobre la xantofilas, se encontraron en hojas de maíz expuestas a baja temperatura por aclimatación a frío (Leipner *et al.*, 2000). MacRae y Ferguson (1985), encontraron que el H₂O₂ se acumula y hay una inhibición en la actividad de la catalasa en algunas especies de

plantas durante la exposición a frío, por ello sugirieron, que la baja actividad de ésta enzima puede resultar de la inhabilitación de las membranas de los peroxisomas para permitir el paso de los precursores de la catalasa dentro del peroxisoma, y que la protección de los efectos dañinos del H_2O_2 está a cargo de otras enzimas antioxidantes.

El estrés oxidativo puede ser un factor significativo en respuesta al daño por frío, por eso, algunas plantas son más sensibles que otras a este estrés (Burdon *et al.*, 1994). En trigo, plántulas de maíz y en *Arabidopsis* se ha encontrado que la tolerancia y la susceptibilidad a la aclimatación al frío, está dada por los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes (Prasad *et al.*, 1994a; O'Kane *et al.*, 1996; Scebba *et al.*, 1998; Leipner *et al.*, 2000). Lo cual indica, que durante la aclimatación al frío, se producen señales inductoras de ciertas enzimas antioxidantes, pero en plántulas no aclimatadas, el H_2O_2 puede incrementarse a niveles tóxicos debido a los bajos niveles de las enzimas antioxidantes (Prasad *et al.*, 1994a). Se tienen evidencias de que el incremento en la actividad de la catalasa induce tolerancia a frío en plántulas de maíz preaclimatadas, mientras que en las no aclimatadas la actividad de dicha enzima disminuye así como la actividad fotosintética. Por lo que se ha propuesto que el aumento en la expresión de la actividad de la catalasa puede incrementar la tolerancia al estrés a frío (Prasad, 1996). Sin embargo, se ha encontrado que las bajas temperaturas afectan a todas las enzimas antioxidantes. Se observó que en células del mesófilo y en el haz de la vaina de plantas de maíz, la baja temperatura induce cambios en la distribución del H_2O_2 , así como en la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y las peroxidasa (Pastori *et al.*, 2000), y en la inducción de nuevas isoenzimas de superóxido dismutasa en *Potentilla astrisanguinea* (Sahoo *et al.*, 2001). En papa el H_2O_2 producido durante el almacenamiento de tubérculos a baja temperatura es eliminado por la acción conjunta de la catalasa y la ascorbato peroxidasa (Mizuno *et al.*, 1998). Además, el sistema antioxidante cambia ajustándose a fluctuaciones diurnas de luz, temperatura y condiciones ambientales, lo que es indispensable para tolerar este factor de estrés (Peltzer y Polle, 2001).

Señalización en las respuestas a baja temperatura

No se sabe exactamente cómo llega la señal de un tipo de estrés determinado y cuáles son los receptores primarios en la célula que los perciben. La baja temperatura (dependiendo de la intensidad y fluctuación) al originar cambios en la fluidez de la membrana, pueden ser detectados por uno o por distintos receptores que pueden iniciar la cascada de señales para inducir una respuesta rápida, por ello se cree, que la membrana es el principal termoreceptor de las bajas temperaturas, incluyendo la reorganización del citoesqueleto. En células en suspensión de alfalfa se demostró que la fluidez de la membrana actúa como termosensor (Örvar *et al.*, 2000).

Otros receptores de señales a bajas temperaturas son los canales de Ca^{2+} , el complejo de la proteína G y la histidina cinasa (Xiong *et al.*, 2002). Los canales de Ca^{2+} son activados por la reorganización del citoesqueleto durante el estrés por frío e induce el flujo de Ca^{2+} (Örvar *et al.*, 2000).

Otro mensajero secundario importante en la señalización a bajas temperaturas puede ser el IP_3 (inositol trifosfato), que a su vez, estimula el incremento de Ca^{2+} , el cual inicia la cascada de respuestas para la inducción de tolerancia (Esquema 2, (Xiong *et al.*, 2001)

Las ERO principalmente el H_2O_2 , también pueden directamente regular la transducción de señales sin Ca^{2+} (Esquema 2, Xiong *et al.*, 2002), ya que son capaces de atravesar las membranas e iniciar una cascada de señales para generar respuestas que llevan a la inducción de la expresión genética (Neill *et al.*, 2002ab), o bien, pueden activar la cascada de señales río abajo vía Ca^{2+} (Esquema 2, Xiong y Zhu, 2002).

Existen evidencias de la participación de las ERO en la señalización directa de proteínas como la fosfatasa tirosina, y en mediar las rutas de las MAPK y las fosfoproteínas acopladas al Ca^{2+} , que inducen la síntesis de osmolitos y antioxidantes. Estas rutas inducen LEAs y DRE que pueden regular la producción de osmolitos (Esquema 2, Xiong y Zhu, 2002).

Por otro lado también, el estrés por frío induce la acumulación de ABA. La función del ABA en las señales de transducción del estrés osmótico fue estudiada en

mutantes de *Arabidopsis* deficientes en ABA *aba1-1*, y mutantes sensibles a ABA *abi1-1* y *abi2-1*, la conclusión general de estos trabajos fue que mientras la expresión de genes regulados por bajas temperaturas son relativamente independientes de ABA, la regulación de genes de estrés osmótico puede ser activada a través de rutas tanto dependientes e independientes de ABA (Thomashow, 1999).

2.5. Ácido abscísico.

El ácido abscísico (ABA) es un regulador del crecimiento esencial de las plantas que se encuentra en pequeñas cantidades en todos los tejidos vegetales. El ABA ($C_{15}H_{20}O_4$) se sintetiza en los cloroplastos y otros plastidios. Su fotoisomerización produce el desdoblamiento en una proporción de aproximadamente el 20%, en los isómeros *cis* y *trans*, siendo este último biológicamente inactivo (Zacarias y Lafuente, 2000).

El ABA tiene efectos fisiológicos que parecen estar implicados en respuestas al estrés y en procesos del desarrollo, tales como: cierre de estomas, control del desarrollo embrionario en semillas, inhibición del crecimiento y abscisión (Zacarias y Lafuente, 2000).

El ABA en el estrés hídrico y cierre de los estomas.

Una respuesta característica en las plantas superiores frente al estrés hídrico, es el incremento en el contenido de ABA. La función del ABA protegiendo a las plantas frente al estrés es doble: primero reduce la transpiración y después, induce la síntesis de proteínas que favorecen la resistencia a la desecación. El ABA induce cierre de estomas inhibiendo una H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de las células guarda. El ABA puede sintetizarse en las células guarda o puede ser el resultado de la redistribución del ABA dentro de la hoja, en respuesta al estrés hídrico. En células aisladas, se comprobó que el contenido de ABA puede incrementarse hasta 20 veces en las células guarda como consecuencia de un estrés hídrico donde el ABA llega vía apoplasto. Esta hormona, también se incrementa en las raíces y en las hojas, separadas o no, de la planta en respuesta al déficit hídrico. Del mismo modo, se comprobó que el ABA formado en las raíces se

transporta a través del xilema a las hojas (sentido acropétalo), donde ocasiona el cierre de estomas, aun sin ningún cambio en el estado hídrico de las hojas. Así el aporte de ABA de las raíces, que proviene de los ápices radiculares, sirve como una señal, mediante la cual las plantas regulan su estado hídrico en los suelos secos para adaptar su funcionamiento antes de que el estrés sea más intenso (Zacarias y Lafuente, 2000).

El ABA en el desarrollo embrionario de las semillas

Aunque existen varios mecanismos de latencia en las semillas, el ABA desempeña un papel muy importante en este proceso. El ABA reprime la expresión de numerosos genes específicos de la germinación. Otra función del ABA en la embriogénesis, es la regulación de la síntesis de proteínas implicadas en la tolerancia a la desecación. En los estadios medio y avanzado del desarrollo de la semilla se acumula RNAm que codifica proteínas LEA, abundantes en tales estadios. Estas proteínas contienen escasos residuos hidrófobos y desempeñan una función protectora frente a los daños producidos en el citoplasma durante la desecación (Zacarias y Lafuente, 2000).

El ABA en la inhibición del desarrollo vegetativo

La respuesta más común de las células al ABA es la inhibición del crecimiento. La dormancia o latencia de las hojas y yemas se ha relacionado con la acumulación de ABA que tiene lugar durante los días cortos. Este proceso puede inducirse, además, aplicando exógenamente la hormona. El efecto de la hormona parece estar relacionado directamente con la inhibición del desarrollo, ya que no induce otras características relacionadas con la latencia de las yemas. Este efecto del ABA no ocurre en todas las especies, probablemente debido a que otros compuestos, como las giberelinas, podrían actuar contrarrestando la acción del ABA en este proceso (Zacarias y Lafuente, 2000).

El ABA tiene efectos diferentes sobre el crecimiento del tallo y la raíz. El déficit hídrico moderado incrementa la elongación de la raíz, mientras si la sequía es fuerte, la inhibe. La inhibición del crecimiento del tallo es consecuencia del efecto del ABA sobre la extensibilidad de la pared celular (Zacarias y Lafuente, 2000). Otra posibilidad en la inhibición del crecimiento es el efecto sobre las membranas de las

raíces, donde hace más positiva su carga, con lo que se incrementa la tendencia de las raíces a adherirse a superficies negativas, y es probable que este efecto participe en la rápida pérdida de iones K^+ de las células oclusivas (lo que implica la inhibición de una ATPasa de la membrana plasmática), y quizá en la capacidad del ABA de inhibir con rapidez el crecimiento inducido por auxinas. La interferencia en la síntesis de proteínas y otras enzimas podría ayudar a explicar efectos a largo plazo sobre el crecimiento y desarrollo (Salisbury y Ross, 1994).

Mecanismos de acción del ABA

Los diversos efectos fisiológicos mediados por el ABA indican que éste posee múltiples mecanismos de acción. Hasta ahora se carece de pruebas directas de la existencia de receptores del ABA y, por lo tanto, falta caracterizar la ruta completa de las señales del ABA.

En el cierre estomático, el flujo de calcio intracelular constituye un segundo mensajero en la transmisión de la señal del ABA. En células guarda, se demostró que el ABA incrementa la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, cinco minutos antes del cierre de estomas. También se probó que la adición de inositol trifosfato (IP_3) incrementa el Ca^{2+} citoplasmático y cierra los estomas. Asimismo, el ABA estimula cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático de otros tejidos, como en raíces y coleoptilos de maíz o en protoplastos de la capa de aleurona de cebada. El ABA modula la expresión de diversos genes, que probablemente controlan algunos de los procesos fisiológicos descritos anteriormente. Se han aislado e identificado diferentes genes que se expresan por acción del ABA y contienen secuencias específicas de respuesta a esta hormona (Esquema 2, Zacarias y Lafuente, 2000).

2.5.1. El ABA y el estrés oxidativo.

El ABA regula procesos importantes en las respuestas de las plantas al medio ambiente (Rock, 2000), incluyendo; sequía, salinidad, lesiones por heridas, calor y frío, donde actúa como regulador de las respuestas a estas condiciones de estrés (Xiong *et al.*, 2001; Larkindale y Knight, 2002) en los procesos de aclimatación y/o tolerancia cruzada de las plantas (Prasad *et al.*, 1994b; Ristic *et al.*, 1998).

Los detalles de cómo las señales de ABA se traducen en una respuesta fisiológica aun se desconocen. Sin embargo, evidencias circunstanciales indican que un modelo de acción del ABA puede estar relacionado al estrés oxidativo en las células de las plantas ya que, se encontró que las respuestas del ABA causan un incremento en la generación e incremento del H_2O_2 (Guan *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001a).

Tres líneas de evidencias indican que un modo de acción del ABA está relacionado al estrés oxidativo en las células de las plantas. Primero, el ABA causa un incremento en las ERO (Guan *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; Jiang y Zhang 2001; Murata *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001a). Segundo, el ABA induce la expresión de genes que codifican para el sistema antioxidante incluyendo antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Guan *et al.*, 2000; Jiang y Zhang, 2001, 2002a). Y tercero, tratamientos con altas concentraciones de ABA resultan en daño oxidativo a la célula (Jiang y Zhang, 2001).

Bajo condiciones de estrés, ABA y H_2O_2 son comúnmente generados en muchos sistemas biológicos (Zhang *et al.*, 2001a). Las ERO tienen una función importante en la transducción de señales por ABA y llevan a la inducción del sistema antioxidante de defensa (Guan *et al.*, 2000; Jiang y Zhang, 2002b). El ABA activa la bomba de la membrana plasmática, donde, la NADPH oxidasa transfiere electrones del NADPH citosólico al O_2 para formar O_2^- , que después dismuta a H_2O_2 , esto puede estar involucrado en las señales de transducción de ABA en las células de las plantas (Pei *et al.*, 2000; Jiang y Zhang, 2002b, 2003).

El Ca^{2+} también está involucrado en la transducción de señales del ABA, ya que este incrementa, tanto en el espacio extracelular como intracelular en respuesta al ABA (Esquema 2, Pei *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2001). En el cierre de estomas inducido por ABA en *Arabidopsis*, el ABA induce la producción de H_2O_2 y éste activa los canales de Ca^{2+} que son los componentes en la transducción de señales del ABA (Pei *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2001). Esta observación indica que el Ca^{2+} está río abajo de la producción de ERO en la señalización de ABA, y que las rutas de ERO y Ca^{2+} están involucradas en la inducción del sistema antioxidante (Jiang y Zhang, 2003).

Las evidencias indican que el H₂O₂ es un intermediario de la señalización de ABA importante y necesario en el cierre de estomas. Ya que con la aplicación exógena de H₂O₂ hay un aumento significativo en el cierre de estomas de *Vicia faba* (Zhang *et al.*, 2001b) y en *Arabidopsis* (Pei *et al.*, 2000).

La función del H₂O₂ como un intermediario en la señalización de ABA en las células guarda fue estudiado en *Arabidopsis*, no se sabe si el H₂O₂ actúa como segundo mensajero para la inducción de cierre de estomas en respuesta a ABA en otras plantas, ni dónde es la fuente de generación de H₂O₂ y ABA en las células guarda. La microinyección de ABA dentro de las células guarda, induce la producción de H₂O₂, la cual precede al cierre de estomas. La inducción de cierre de estomas por H₂O₂ es reversible con bajas concentraciones de ácido ascórbico o de catalasa (Pei *et al.*, 2000).

2.5.2. El ABA en la inducción de tolerancia al frío.

El ABA desempeña una función importante en las respuestas a baja temperatura y está correlacionado con el aumento de la resistencia a frío en algunas especies de plantas (Bravo *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2005a).

Dos líneas de evidencias sugieren la participación del ABA en la tolerancia a bajas temperaturas; primero, durante la exposición a frío el contenido de ABA se incrementa en algunas plantas que muestran la propiedad de aclimatación, segundo la aplicación de ABA induce protección contra el daño por baja temperatura (Ristic *et al.*, 1998; Tamminen *et al.*, 2001). La función del ABA al disminuir el daño por frío incluye: incremento en la permeabilidad de la membrana para facilitar el intercambio de agua través del sistema de raíces y por lo tanto suplir de agua a las hojas; cierre de estomas; equilibrio de la membrana para evitar la pérdida de electrolitos; estabilización del citoesqueleto, y modificando la expresión genética (Ristic *et al.*, 1998). El ABA parece mediar procesos de estrés osmótico ya que se acumula de forma endógena ante ósmosis alta, salinidad, desecación y frío, durante estas condiciones de estrés muchos genes relacionados con la osmorregulación son expresados, lo que también ocurre con la aplicación exógena de ABA (Guan y Scandalios, 1998a).

En algunas especies de plantas, la tolerancia al frío inducida por ABA, está asociada al incremento de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, como se observó en *Stylosanthes gjanesis* (Prasad *et al.*, 1994b; Zhou *et al.*, 2005a).

De gran interés resulta la estrecha relación entre ABA y la catalasa. De los elementos que controlan la expresión génica de CAT, la caja G o ABRE (elementos que responden al ABA), está entre los más importantes en el control de respuestas al estrés. Estos elementos están involucrados en las respuestas al estrés osmótico y al ABA en embriones y hojas de trigo (Luna *et al.*, 2005).

La relación entre ABA y la expresión génica de CAT es compleja. Los transcritos de genes que responden al ABA y a CAT1 se incrementan simultáneamente en las hojas durante la desecación. En contraste, mientras la mayoría de los genes que responden al ABA se expresan durante las últimas etapas de la embriogénesis en *Zea maiz*, los transcritos de CAT1 disminuyen en el mismo periodo. Esto sugiere que la ruta de transducción de señales es compleja, es involucra otros controles que interactúan. El ABA parece tener dos funciones importantes en las respuestas de estrés: primero disminuye la actividad del metabolismo básico permitiendo un reajuste de las diferentes rutas metabólicas en condiciones de estrés o cambios en el desarrollo; el reajuste del metabolismo es un proceso clave para asegurar la supervivencia de las plantas, particularmente en órganos reproductivos como semillas; segundo asegura una alta capacidad de defensa antioxidante en esos momentos. Esto es importante, cuando el reto de la célula para mantener la homeostasis es grande, en condiciones de estrés oxidativo (Luna *et al.*, 2005).

2.6. El H₂O₂ en la inducción de tolerancia al frío.

El H₂O₂ está involucrado en las respuestas de aclimatación y tolerancia cruzada (Chen *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2002a) y tolerancia a bajas temperaturas (Prasad *et al.*, 1994a; Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora y López, 2006; López-Delgado *et al.*, 2007).

El H₂O₂ aplicado en forma exógena incrementa la tolerancia a frío en plántulas de maíz (Prasad *et al.*, 1994a) y en dos variedades de microplantas de papa con

marcada diferencia en la sensibilidad a frío (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora y López, 2006; López-Delgado *et al.*, 2007). Existen evidencias que indican que la participación de H₂O₂ como señal para la inducción de tolerancia a bajas temperaturas es por respuestas en el sistema antioxidante o compuestos relacionados con protección celular. Así, se ha reportado que el H₂O₂ aplicado en forma exógena, puede inducir tolerancia al frío por diferentes vías tales como: incremento e inducción de H₂O₂ (Rao *et al.*, 1997); por la acumulación de proteínas de choque térmico (Banzet *et al.*, 1998); por incremento del ácido salicílico (León *et al.*, 1995); por incremento en la actividad de la ascorbato peroxidasa (Levinsh *et al.*, 2000); por aumento de los transcritos de la glutatión S-transferasa (Seppänen *et al.*, 2000); por acumulación de glutatión reducido (Kocsy *et al.*, 2001); por cambios en las actividades enzimáticas de APX y CAT y contenido de H₂O₂, como se demostró en microplantas de papa (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora y López, 2006; López-Delgado *et al.*, 2007).

La participación del H₂O₂ en la inducción de tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico, así como la participación en la inducción de la expresión genética, es amplia; sin embargo, las concentraciones a las cuales actúa y cómo actúa depende de muchos factores, de este modo, se encontró que la función de H₂O₂ en la inducción y participación en la transducción de señales puede ir de concentraciones fisiológicas muy bajas como de 10 µM a concentraciones altas como 50 mM (Desikan *et al.*, 2000; Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora y López 2006) y que las respuestas están directamente relacionadas a la intensidad del estrés (Mora y López, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que algunos compuestos como el ácido salicílico que inducen tolerancia a estrés biótico y abiótico (López-Delgado *et al.*, 1998a; Scott *et al.*, 1999; Senaratna *et al.*, 2000) lo hacen a través de un incremento de H₂O₂, mismo que actúa como señal para la inducción de las respuestas de tolerancia (Rao *et al.*, 1997).

2.6.1. Efectos del H₂O₂ en la papa.

Se han reportado algunos efectos fisiológicos del H₂O₂ en papa relacionados con el sistema de producción de semilla “*in vitro*-invernadero-campo” (sección 2.1.1.1; López *et al.*, 1985).

Así, López-Delgado y colaboradores (1998a), reportaron que el tratamiento de H₂O₂ sobre microesquejes incrementó la termotolerancia, efecto que se mantuvo un mes después del tratamiento.

En plantas de papa cultivadas en campo que fueron tratadas con H₂O₂, se encontró un incremento significativo en el contenido de almidón, en el diámetro de los tallos y mayor contenido de lignina (López-Delgado *et al.*, 2005).

En microplantas provenientes de microesquejes preincubados en H₂O₂, se indujo tolerancia a la exposición a baja temperatura en una variedad sensible al frío (Mora-Herrera *et al.*, 2005), y estas respuestas dependieron de la variedad, de la concentración y tiempo de exposición al frío (Mora y López, 2006), además estas respuestas están asociadas a la actividad enzimática antioxidante.

Preincubaciones de H₂O₂ también inducen tuberización *in vitro* en sustitución del cycocel (ccc), se encontró además, que los efectos del H₂O₂ son a largo plazo en las respuestas de tuberización (Sánchez, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico.

Se utilizaron plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L., libres de virus de las variedades Alpha y Atlantic, obtenidas del Banco de Germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología del Programa Nacional de Papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Metepec, Estado de México, México.

Los reactivos utilizados en este trabajo se encuentran en el anexo 5.

3.2. Condiciones de cultivo.

Todos los experimentos se iniciaron a partir de esquejes con una yema axilar con hoja. Estos esquejes fueron cultivados y subcultivados entre 28 y 35 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) como se describe en Espinoza *et al.* (1986), con lo cual se mantuvo una fuente permanente de material biológico.

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperíodo de 16 horas a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y una radiación de $ca\ 35\ \mu\text{mol m}^2\ \text{seg}^{-1}$, 400-700 nm.

Los almácigos y macetas con las plantas o los esquejes se mantuvieron en condiciones de invernadero ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ día y $16 \pm 2^\circ\text{C}$ noche).

3.3. Medios de cultivo.

El medio básico se preparó con sales inorgánicas del medio de Murashige y Skoog MS (Anexo 1) adicionado con: sacarosa 30 g, glicina 2 mg, tiamina HCl 0.10 mg, mio-inositol 100 mg, y D-pantotenato de calcio 10 mg por litro (Anexos 1 y 5).

El medio de cultivo se preparó mezclando las cantidades requeridas de sales inorgánicas y vitaminas. La sacarosa, las vitaminas y las sales se tomaron de soluciones concentradas conocidas (Anexo 1), se aforó y se ajustó el pH entre 5.6 y 5.8 con hidróxido de potasio (KOH) 1N, después se agregó el agar o fitagel el cual se disolvió con calor (Anexo 1). El ácido abscísico (ABA, Anexo 5), se agregó al medio de cultivo antes de aforar y medir el pH. Se utilizaron frascos de 70 mm x 45 mm con tapa

translúcida con 20 mL de medio y estos fueron sellados con película (kleen pack), también se utilizaron tubos de 2 x 15 cm con 10 mL de medio, sellados con papel de aluminio.

Los medios de cultivo y materiales de siembra (cajas petri, pinzas y bisturí) se esterilizaron en un autoclave horizontal a 15 libras cm^{-2} de presión y 120°C durante 15 minutos (para las especificaciones de los equipos ver Anexo 6).

3.4. Solución concentrada de ácido abscísico (ABA).

Para todas las concentraciones de ABA (Isomero (\pm) cis-trans, Anexo 5) utilizadas en este trabajo se hizo una solución concentrada de 10 mg/100mL. El ABA se disolvió previamente con 0.5 mL de KOH 1N y se aforó a 100 mL de H_2O (destilada).

3.5. Soluciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Las soluciones de H_2O_2 se prepararon con agua destilada estéril agregando el H_2O_2 (Anexo 5) y 2 gotas de Tween por cada 50 mL de solución, esto para romper la tensión superficial y favorecer la penetración del H_2O_2 a las células. Estas soluciones se prepararon al momento de las incubaciones.

3.6. Siembra en suelo.

Siembra de microplantas completas en almácigos

Plantas completas provenientes de condiciones *in vitro* se enjuagaron perfectamente y se sembraron en almácigos (30 mm de ancho y 50 mm de profundidad) usando como sustrato “peat moss” (mezcla Sunschine Canadá) y agrolita en una proporción 2:1. Las microplantas permanecieron en los almácigos por 24 horas en condiciones de invernadero antes de exponerlas al frío ($-6 \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Siembra de microesquejes en almácigo

Esquejes (con una yema axilar y hoja) de plantas *in vitro*, se sembraron en almácigos (30 mm de ancho y 50 mm de profundidad), usando como sustrato “peat moss” y agrolita en una proporción 2:1. Los esquejes permanecieron en los almácigos por 24 horas en condiciones de invernadero antes de exponerlas al frío ($-6 \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Siembra de microplantas en maceta

Plantas completas provenientes de condiciones *in vitro* se enjuagaron y se sembraron en macetas (16 cm ancho x 12 de altura), se utilizó “peat moss” y agrolita en una proporción 2:1 como sustrato y permanecieron en condiciones de invernadero el tiempo requerido. Las plantas sembradas en almácigo y/o maceta se regaron dos veces por semana.

3.7. Exposición a baja temperatura (frío).

Una vez que las microplantas (o microesquejes) estuvieron 24 horas en suelo (para su recuperación al trasplante a suelo), se expusieron a baja temperatura* ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$) en oscuridad en un congelador de acuerdo con los tiempos establecidos en el diseño de los experimentos. Después se mantuvieron en condiciones de invernadero para su recuperación.

*Para el modelo empleado en este trabajo se utilizó como sinónimo: baja temperatura y frío.

3.8. Evaluación de la supervivencia.

La supervivencia se evaluó 15 días después del tratamiento al frío. Se consideró viva aquella planta que tuviera al menos una yema axilar completamente verde y en crecimiento. Se consideraron las yemas bajo el sustrato como se describió en Mora-Herrera *et al.* (2005) y Mora y López (2006).

3.9. Incubaciones en H₂O₂.

Incubaciones de esquejes en H₂O₂

Esquejes de plantas *in vitro* se preincubaron en concentraciones 0, 5, 15 y 25 mM de H₂O₂, durante una hora en condiciones de luz (*ca* $15 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$, 400-700 nm), en cajas petri conteniendo agua-agar 0.8%, una vez finalizada la preincubación, los esquejes se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se cultivaron 4 semanas en medio básico (MS) en condiciones *in vitro* (Sección 3.2).

Incubaciones de microplantas completas en H₂O₂

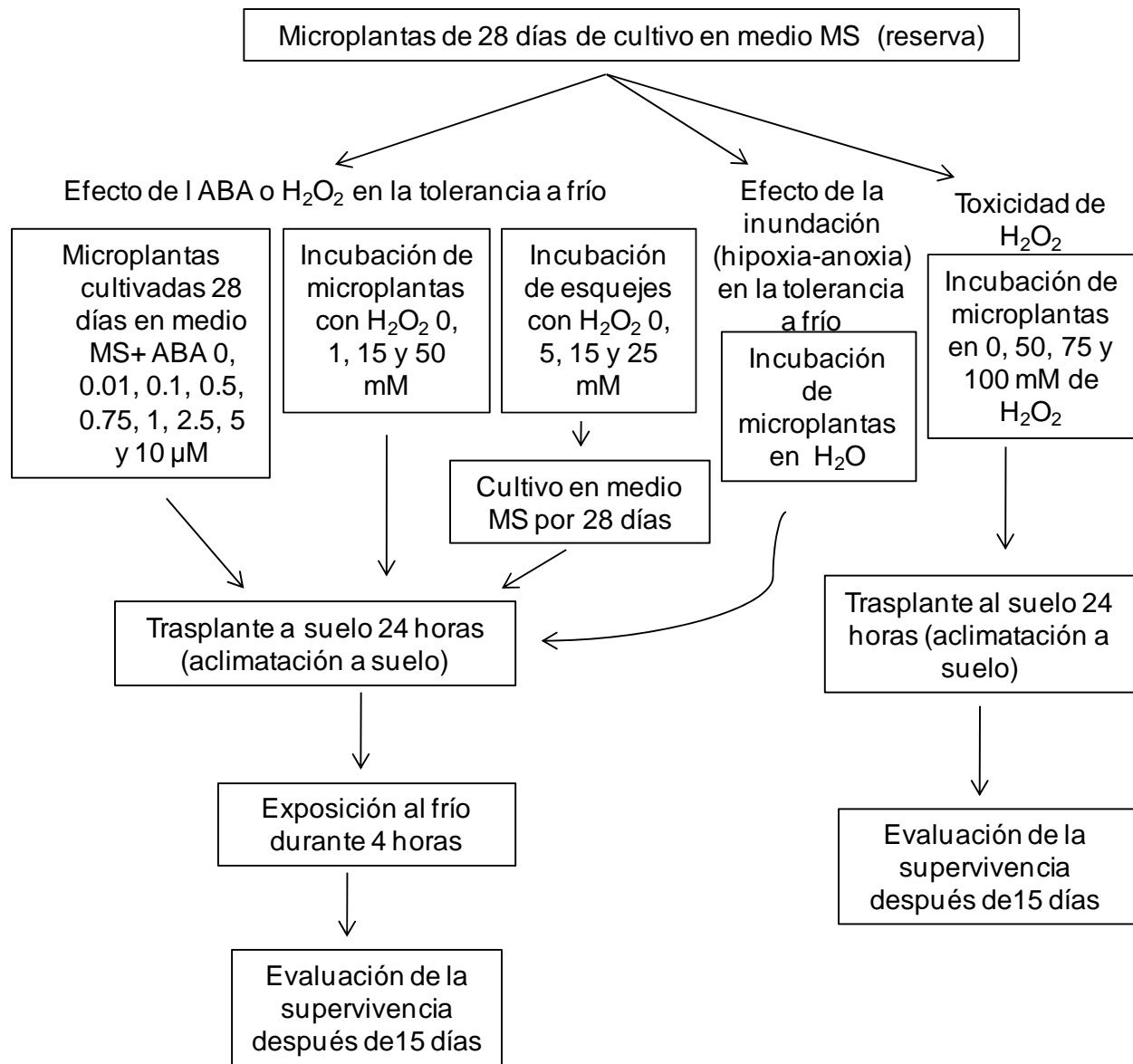
Plantas completas (incluida la raíz) de 28 días de cultivo *in vitro*, se enjuagaron con agua (para remover el medio de cultivo con agar), se colocaron sobre papel absorbente por 3 minutos para quitar el exceso de agua y se incubaron durante 1 hora en concentraciones de 0, 1, 15, 50 75 y 100 mM de H₂O₂ en condiciones de luz fluorescente (ca 15 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, 400-700 nm), después de ese tiempo se enjuagaron tres veces con agua para detener el efecto del H₂O₂ y se sembraron en almácigos (Sección 3.6.1).

3.10. Descripción de los experimentos.

3.10.1. Modelo de supervivencia a baja temperatura.

Modelo de supervivencia a baja temperatura en plantas completas

El modelo de supervivencia utilizado en esta investigación fue el generado previamente por Mora (2002). En este modelo las plantas *in vitro* de 3, 4, 5, 6 y 7 semanas de edad cultivadas en medio MS, fueron trasplantadas al suelo y 24 horas después se expusieron a baja temperatura ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$) por 2, 3 ó 4 horas. Las plantas permanecieron en condiciones de invernadero para su recuperación. De acuerdo con los resultados de mínima sobrevivencia se eligió el modelo de las siguientes condiciones experimentales: microplantas de 4 semanas de edad expuestas a baja temperatura ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$) por 4 horas (Mora-Herrera *et al.*, 2005).



Esquema 4. Diagrama de flujo de las evaluaciones de supervivencia realizadas con microplantas pretratadas con ABA o H₂O₂.

Modelo de supervivencia de esquejes al frío

Esquejes con una yema axilar y hoja, provenientes de condiciones *in vitro* (sección 3.2) se sembraron en almácigos (sección 3.6). Después de 24 horas en el suelo, se expusieron a frío ($-6 \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas en oscuridad. Posteriormente se mantuvieron en condiciones de invernadero para su recuperación. La supervivencia se evaluó 15 días después de la exposición al frío. Los experimentos se

realizaron entre 3-13 veces con 12 plantas por tratamiento**. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ($p \leq 0.05$).

**Todas las repeticiones de los experimentos de este trabajo se realizaron 3 veces como mínimo dependiendo de la uniformidad de los resultados. Se utilizaron 12 plantas por tratamiento en cada repetición.

3.10.2. Supervivencia de microplantas pretratadas con ABA o H₂O₂.

Microplantas preincubadas con ABA 0, 0.01, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5 y 10 μ M durante 28 días o microesquejes preincubados con 0,1, 5, 15 mM de H₂O₂ por 1 hora y microplantas preincubadas con 0, 15, 25 y 50 mM de H₂O₂ por 1 hora; fueron trasplantados al suelo, después se expusieron al frío por 4 horas y posteriormente se mantuvieron en condiciones de invernadero para su recuperación (Esquema 4).

Estos experimentos se realizaron entre 4-10 veces. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ($p \leq 0.05$).

3.10.2.1. Evaluación de la toxicidad del tratamiento de ABA.

Microplantas preincubadas en ABA 0 y 10 μ M durante 4 semanas se sembraron en un almácigo (sección 3.6). La supervivencia se evaluó 15 días después. Estos experimentos se realizaron 3 veces. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ($p \leq 0.05$).

3.10.2.2. Evaluación de la toxicidad del tratamiento de H₂O₂.

Microplantas completas de 28 días de edad se incubaron en 0, 50, 75 y 100 mM de H₂O₂ de la manera ya descrita (sección 3.9) sin exponerlas a frío, se mantuvieron en condiciones de invernadero (sección 3.2) y se evaluó la supervivencia (sección 3.8) 15 días después de la incubación en H₂O₂. Estos experimentos se realizaron 4 veces. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ($P \leq 0.05$).

3.10.2.3. Efecto de la inundación (hipoxia- anoxia) en las preincubaciones de H₂O₂.

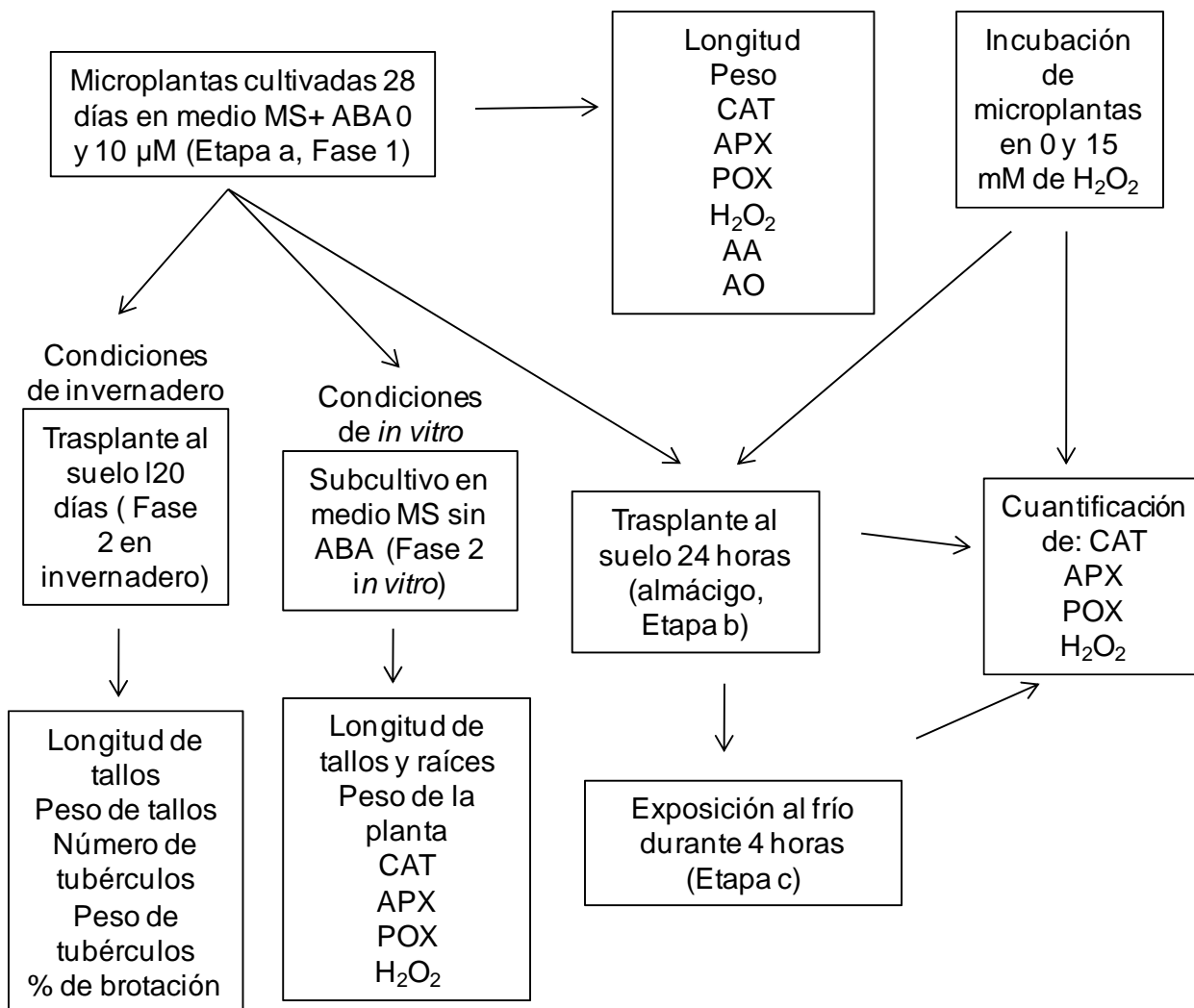
Se evaluó el efecto de la anoxia generada por la incubación en H₂O₂ en microplantas de 4 semanas de cultivo. Las microplantas se incubaron en agua destilada estéril durante una hora en las mismas condiciones que las incubaciones con H₂O₂ (sección 3.9), se sembraron en suelo (sección 3.6), y se expusieron a frío por 4 horas. 15 días después se evaluó la supervivencia (sección 3.8). Las microplantas utilizadas como testigo siguieron el mismo procedimiento, excepto que no se incubaron en agua. Estos experimentos se realizaron 4 veces. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ($p \leq 0.05$).

3.10.3. Cuantificación de las actividades enzimáticas antioxidantes y contenidos de H₂O₂ y AA.

Se tomaron muestras de plantas preincubadas en ABA 0 y 10 μ M en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas de trasplante al suelo y c) al término de 4 horas de exposición al frío. Se cuantificó la actividad enzimática de la CAT, APX y POX, y contenido de H₂O₂. La actividad enzimática de la AO y el contenido de AA sólo se cuantificó en la etapa "a". La actividad enzimática de la CAT también se visualizó utilizando geles nativos de actividad en el etapa "a".

En las microplantas preincubadas con 0 y 15 mm de H₂O₂ se cuantificó la actividad enzimática de la CAT, APX y POX en las tres etapas.

Todas las cuantificaciones se realizaron al menos 4 veces. Los datos fueron analizados por medio de la prueba t Student ($P \leq 0.05$), en algunos casos los promedios de los tratamientos se sometieron a la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante el programa Statgraphics plus 5.0.



Esquema 5. Diagrama de flujo de las evaluaciones de crecimiento, rendimiento, actividades enzimáticas, H₂O₂ y AA, en microplantas preincubadas en ABA o H₂O₂.

3.10.4. Subcultivo sin ABA o trasplante en invernadero de microplantas pretratadas con ABA.

Subcultivo sin ABA

Microplantas incubadas en 0 y 10 μM de ABA por 28 días (Fase 1) fueron trasplantadas sin raíces a medio MS en forma individual (tubos de 2 x 15 cm) por otros 28 días (Fase 2 *in vitro*). Se evaluó longitud de los tallos, peso de las plantas completas, las actividades enzimáticas de las CAT, POX, APX y el contenido de H₂O₂. La longitud de las raíces fue evaluada sólo en la Fase 2 *in vitro*. Estos experimentos se realizaron 4

veces con 12 plantas por tratamiento. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t-Student ($p \leq 0.05$).

Trasplante en condiciones de invernadero de microplantas pretratadas con ABA

Microplantas incubadas en 0 y 10 μM de ABA por 28 días fueron trasplantadas en condiciones de invernadero en macetas (sección 3.6) durante 120 días (Fase 2 en invernadero). Las plantas se regaron dos veces por semana hasta los 90 días de cultivo. A los 30 días del cultivo se llenó la maceta de suelo (aporcar) e inició la fertilización con los nutrientes de 170-210-170-90-20-20 nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio, cada 15 días 5 veces en el ciclo. A los 100 días de la siembra las plantas fueron contadas y se evaluó la longitud y el peso del tallo. A los 120 días se evaluó la cosecha en número y peso de tubérculos. Los tubérculos cosechados se sumergieron 15 min en ácido giberélico (5 ppm) y se mantuvieron en bolsas de papel estraza bajo fotoperíodo de 16 horas de luz difusa en condiciones de cámara de crecimiento a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 3 meses después se evaluó el porcentaje de la brotación.

3.11. Técnicas empleadas.

Todas las cuantificaciones enzimáticas se midieron en tres muestras de cada tratamiento y por triplicado cada una en cada repetición experimental.

3.11.1. Cuantificación de la actividad enzimática de la CAT.

La cuantificación de la actividad enzimática de la catalasa (EC 1.11.1.6) por espectrofotometría se realizó de acuerdo al método descrito por Aebi (1984).

Extracción de la proteína total

El tejido de la microplanta (sin raíces) se maceró con nitrógeno líquido y la proteína total se extrajo en una proporción de 1 g: 4 mL con el amortiguador de fosfato de potasio (50 mM pH 7.2) conteniendo 5 mM de dithiothreitol (DTT), 1 mM de ácido etileno dinitrilo tetracético (EDTA) y 2% de polyvinyl pirrolidona (PVP; Anderson *et al.*, 1995). El homogenado se centrifugó a 11 000 x g durante 10 minutos a 4°C . La fracción sobrenadante se usó para medir la actividad enzimática de la catalasa y de la POX en espectrofotómetro, y para evaluar la actividad de la catalasa en geles nativos con

algunas modificaciones de acuerdo al método propuesto por Cruz-Ortega *et al.* (2002, Anexo 2).

Mezcla de reacción

La actividad enzimática de la catalasa se midió en la mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de potasio y sodio 50 mM pH 7.0, 10 μ L del extracto de proteína (aproximadamente 100 μ g de proteína) y 30 mM de H₂O₂ en un volumen final de 3 mL. El blanco contenía amortiguador de fosfato de potasio y sodio 50 mM pH 7.0, 10 μ L del extracto de la muestra en un volumen final de 3 mL.

La reacción se inició con la adición de H₂O₂ 30 mM (solución preparada en amortiguador de reacción) a 25-28°C. Se midió el consumo de H₂O₂ como el decremento de la absorbancia a 240 nm en intervalos de 20 segundos durante 3 minutos, para obtener la actividad de la catalasa se usó el coeficiente de extinción para el H₂O₂ $\epsilon = 0.0394 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$.

3.11.2. Cuantificación de la actividad enzimática de la APX.

La cuantificación de la actividad de la ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) por espectrofotometría se realizó de acuerdo al método descrito por Nakano y Asada (1981), con algunas modificaciones de Jiménez *et al.* (1997).

Extracción de proteína total

El tejido de la microplanta (sin raíces) se maceró con nitrógeno líquido y la proteína total se extrajo en una proporción de 1 g: 4 mL con el amortiguador de fosfato de sodio 100 mM pH 7.0, 1 mM de DTT, 5 mM de ácido ascórbico (Mittler y Ziliskans, 1993). La proteína soluble se aisló por centrifugación a 11 000 g por 10 minutos a 4°C. La fracción sobrenadante se usó para medir la actividad de la APX.

Mezcla de reacción

La actividad enzimática de la APX se midió en la mezcla de reacción con amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM pH 7.0, 0.1 mM de ascorbato, 0.1 mM de EDTA, 0.040 mL del extracto de proteína y 2.7 mM de H₂O₂ en un volumen final de 2 mL.

El blanco consistió en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 en un volumen final de 2 mL. La reacción se inició con la adición de H₂O₂, se registró el

decremento en la absorbancia a 290 nm por la oxidación del ascorbato a intervalos de 30 segundos durante 3 minutos a 25-28°C. Para obtener la actividad de la APX se usó el coeficiente de extinción para el ascorbato $\epsilon = 0.28 \text{ mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$.

3.11.3. Cuantificación de la actividad enzimática de la POX.

La cuantificación de la actividad enzimática de la peroxidasa (EC 1.11.1.7) por espectrofotometría se realizó de acuerdo con el método descrito por Srivastava y Dwivedi, (1998).

La extracción de proteína se realizó de la manera descrita para catalasa (Anderson *et al.*, 1995).

Mezcla de reacción

La actividad enzimática de la peroxidasa se midió en la mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0, 3.33 mM de guaiacol, 4 mM de H_2O_2 y 0.020 mL de la muestra en un volumen final de 3 mL. La reacción se inició con la adición de la muestra a 25-28°C. El blanco consistió en el amortiguador de reacción sin extracto de proteína. La oxidación del sustrato (guaiacol) se midió por el incremento en la absorbancia a 470 nm durante 3 minutos en intervalos de 30 segundos. Para determinar la actividad de la peroxidasa se usó el coeficiente de extinción del guaiacol $\epsilon = 2.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$.

3.11.4. Cuantificación de la actividad de la AO.

La cuantificación de la actividad enzimática de la ascorbato oxidasa (E.C.1.10.3.3) por espectrofotometría se realizó de acuerdo con el método descrito por Sanmartín *et al.* (2003).

El tejido de la planta (sin raíces) se maceró con nitrógeno líquido y la proteína total se extrajo en una proporción de 1 g: 10 mL con el amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 6.5 y 4% de PVP. La fracción citoplásmica se aisló por centrifugación a 11 000 g por 10 minutos a 4°C y se usó para medir la actividad de la ascorbato oxidasa.

Mezcla de reacción

La actividad enzimática de la AO se midió en la mezcla de reacción con el amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 5.6, 2.5 mM de EDTA, 0.02 mM de

ácido ascórbico (10 μL de una solución de 10 mM) y 100 μL de la muestra en un volumen final de 2 mL. La reacción se llevó a cabo a 25-28°C y se inició con la adición del ácido ascórbico. El blanco consistió en el amortiguador de reacción con EDTA (sin ácido ascórbico) y 100 μL de la muestra. Se midió a A_{265} por 7 minutos en intervalos de 30 segundos. Se calculó la actividad enzimática usando el coeficiente de extinción del ascorbato $0.129 \epsilon = 0.0128 \text{ mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$.

Las actividades enzimáticas de la CAT, POX, APX y AO se calcularon con la ecuación: $\text{nmol/min/mg de proteína} = \text{Coeficiente de extinción} \times (\text{vol del ensayo/ vol de la muestra en mL}) \times \text{mg de proteína}$.

3.11.5. Cuantificación del contenido de AA.

La cuantificación del contenido de ascorbato se realizó de acuerdo con el método descrito por Foyer *et al.* (1983), con modificaciones basadas en el método de Kampfenkel *et al.* (1995). El AA se midió en tres muestras de cada tratamiento en cada repetición experimental.

Extracción y neutralización de la muestra

Para la extracción y neutralización de la muestra se maceraron 100 mg de tejido en N_2 líquido hasta formar un polvo. La fracción soluble se extrajo con 1 mL de perclorato (HClO_4) 1 M, y se centrifugó a 10,000 g por 10 min. A 500 μL del sobrenadante se agregaron 100 μL de amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH 7.6, y se neutralizó a pH 4-6 con carbonato de potasio (K_2CO_3) 2.5 M.

Para obtener el contenido total de ascorbato, se cuantificó, en forma reducida (AA) y el ascorbato total AA+ DHA (ascorbato oxidado DHA, dehidroascorbato).

Cuantificación del ascorbato reducido (AA)

A 200 μL de muestra neutralizada se agregaron 800 μL de amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH 5.6 y se midió la absorbancia A_{265} antes y después de la adición de 0.5 U de ascorbato oxidasa. La diferencia en la absorbancia antes y después de la adición de la ascorbato oxidasa indicó el incremento del AA reducido en la muestra usando el coeficiente de extinción para el ascorbato a A_{265} de $\epsilon = 0.0128 \text{ mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$.

Cuantificación del ascorbato total (AA + DHA)

A 100 μL de la muestra neutralizada se agregaron 140 μL de amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH 7.6 y 10 μL de DTT 50 mM. La mezcla se incubó durante 30 minutos en la oscuridad a 25°C y después se midió la absorbancia a A_{265} antes y después de la adición de 0.5 U de ascorbato oxidasa, la diferencia en la absorbancia indicó el contenido total de ascorbato.

El contenido de ascorbato oxidado se obtuvo de la diferencia entre el ascorbato total y el ascorbato. El contenido de AA se calculó por la medición de la actividad enzimática de la ascorbato oxidasa, usando el coeficiente de extinción del ácido ascórbico a A_{265} de $\epsilon = 0.0128 \text{ mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$.

3.11.6. Evaluación de la actividad enzimática de la CAT en geles nativos.

La actividad de las catalasas en geles nativos se realizó de acuerdo al método propuesto por Woodbury *et al.* (1971), modificado por Cruz-Ortega *et al.* (2002, Anexo 2).

La extracción de proteína se realizó de la manera descrita (sección 3.11.1) para la catalasa con las modificaciones descritas por Cruz-Ortega *et al.* (2002, Anexo 2).

El gel nativo se realizó de acuerdo con el método de Ougham (1987), sin SDS ni mercaptoetanol.

De 30 a 50 μg de proteína, de cada tratamiento, se separaron en un gel nativo de poliacrilamida 6% de acrilamida Tris 0.375 M pH 8.8 (Anexo 2). La electroforesis se corrió por 18-20 horas a 20 Volts a 4°C. Al finalizar la electroforesis los geles se sumergieron en una solución de metanol al 5% por 5 minutos, se enjuagaron con agua destilada dos veces y posteriormente se incubaron en una solución de H_2O_2 al 0.03%, durante 30 minutos, después se enjuagaron dos veces con agua destilada.

La actividad se reveló con una solución de ferricianuro de potasio al 2% y cloruro férrico al 2%, durante esta reacción, se observaron bandas claras en donde hubo actividad de la catalasa mientras que donde no hubo oxidación de ferricianuro de potasio se formó un precipitado azul. Las bandas claras se observaron en los primeros 2 minutos, la actividad se detuvo agregando una solución de ácido acético al 10% y

metanol al 30%. Después de unos minutos el gel se enjuagó con agua destilada dos veces y se conservó en agua destilada (Anexo 2). Las bandas de actividad se compararon con un marcador de alto peso molecular (Anexo 3). El análisis de las bandas para conocer el peso molecular se realizó con el programa Uvigeltéc versión 12.5.

3.11.7. Cuantificación del contenido de proteína.

La cuantificación de la proteína se realizó de acuerdo con el método de Bradford (1976).

Para la curva estándar se utilizaron diferentes contenidos de proteína albúmina sérica de bovino (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μg), se ajustaron a 100 μL con agua destilada, se añadió 1 mL de reactivo de Bradford (diluido $\frac{1}{4}$), se agitaron y se incubaron por 5 minutos. Se midió la absorbancia a 595 nm. La proteína se cuantificó en tres muestras por tratamiento en cada repetición experimental.

Para el análisis de las muestras se utilizaron 3-5 μL de extracto de proteína. Se calcularon los valores de contenido de proteína por regresión lineal.

3.11.8. Cuantificación del contenido de H_2O_2 .

El contenido de H_2O_2 se cuantificó usando el método de quimioluminiscencia de Warm y Laties (1982), con un luminómetro (Anexo 6).

Curva patrón del contenido H_2O_2

Para encontrar los rangos de concentración de H_2O_2 en tejido de plantas de *S. tuberosum*, se realizó una curva con concentraciones de 882, 441, 220 y 110 μM de H_2O_2 , las cuales se diluyeron 1/7 con ácido tricloroacético 5% (TCA), esta dilución se volvió a diluir 1/8 en TCA, de esta muestra se tomaron 500 μL y se agregaron 4.5 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH , 0.2 M pH 9) y 500 μL de luminol (0.5 mM, diluido en NH_4OH 0.2 M pH 9), de esta mezcla se tomaron 450 μL para la lectura final en el luminómetro. La quimioluminiscencia se inició por inyección de 50 μL de ferrocianuro de potasio (0.5 mM, disuelto en NH_4OH 0.2 M pH 9) y se registró la emisión de fotones sobre 5 s.

Cuantificación del contenido de H₂O₂ en el tejido

El tejido (0.2 g) sin raíces se molió con nitrógeno líquido hasta formar un polvo y la fracción soluble se extrajo con 1.2 mL de TCA; se centrifugó durante 10 minutos a 11 000 g a 4°C.

0.5 mL de la fracción sobrenadante del tejido se filtró a través de una columna para cromatografía líquida (1.5 x 10 cm) conteniendo 0.5 g de resina de Dowex (-1 x 10) de la siguiente manera:

1.- La resina se lavó con 3.5 mL de TCA, dejándose filtrar por goteo (el cual se desechó).

2.- Se agregaron 0.5 mL de la muestra y 0.5 mL de TCA y se colectó por goteo.

3.- La columna se enjuagó por goteo con 3 mL de TCA (el filtrado se colectó con la muestra anterior).

4.- A 0.5 mL de la muestra se agregaron 0.5 mL de luminol y 4.5 mL de NH₄OH.

5.- Para la lectura en el luminómetro se tomaron 450 µL de la muestra anterior y se adicionaron 50 µL de ferrocianuro de potasio.

Cada muestra se filtró adicionalmente en la columna con 0.5 mL de H₂O₂ 441 µM, esta concentración se determinó previamente, estimando los niveles de H₂O₂ en la planta de *S. tuberosum in vitro* (solución interna estándar), para lo cual se midió el contenido de H₂O₂ en microplantas de papa sin tratamiento, los resultados fueron comparados con una curva estándar, usando diferentes concentraciones de H₂O₂. Cada experimento se midió con tres repeticiones por tratamiento y se leyó 6 veces cada una.

IV. RESULTADOS

4.1. Efecto en microplantas del pretratamiento con ABA o H₂O₂.

4.1.1. Efecto en microplantas del pretratamiento con ABA.

La supervivencia se evaluó en microplantas cultivadas con ácido abscísico (ABA) durante 28 días, trasplantadas al suelo y expuestas al frío por 4 horas (Fig. 1, $-6 \pm 1^\circ\text{C}$), con base en el modelo previamente establecido por Mora (2002), en donde, plantas de 4 semanas de edad, trasplantadas al suelo y expuestas al frío por 4 horas, tuvieron menor supervivencia con respecto a otras edades y tiempos de exposición al frío. Además, se consideró, el esquema de producción de semilla del Programa Nacional de Papa, en el cual las microplantas de 4 semanas de edad (28 días de cultivo *in vitro* ± 2 días) son trasplantadas a condiciones de invernadero para producción de semilla (minitubérculo).

Los tratamientos de ABA 5 y 10 μM , incrementaron significativamente la supervivencia a la exposición al frío con respecto al testigo de microplantas de papa variedad Alpha. Mientras que, las concentraciones 1, 2.5, 5 y 10 μM incrementaron la supervivencia significativamente con respecto al testigo en la variedad Atlantic (Fig. 1). El tratamiento de ABA 10 μM fue el que más incrementó la supervivencia en ambas variedades (ABA 0 μM). En la variedad Alpha se incrementó la supervivencia hasta un 66.73%, y en la variedad Atlantic 203.8% con respecto a los testigos. Ningún tratamiento de ABA probado fue letal en las microplantas (Fig. 1).

Las microplantas cultivadas en ABA presentaron inhibición en el crecimiento de tallos (Fig. 2) y raíces (Fig. 3), inhibición que en las plantas tratadas con ABA 5 y 10 μM fue más marcada. La inhibición del crecimiento con el tratamiento ABA 10 μM fue de 88% (Fig. 2) y la inhibición de las raíces fue de 95.5% en ambas variedades con respecto a los testigos (Fig. 3).

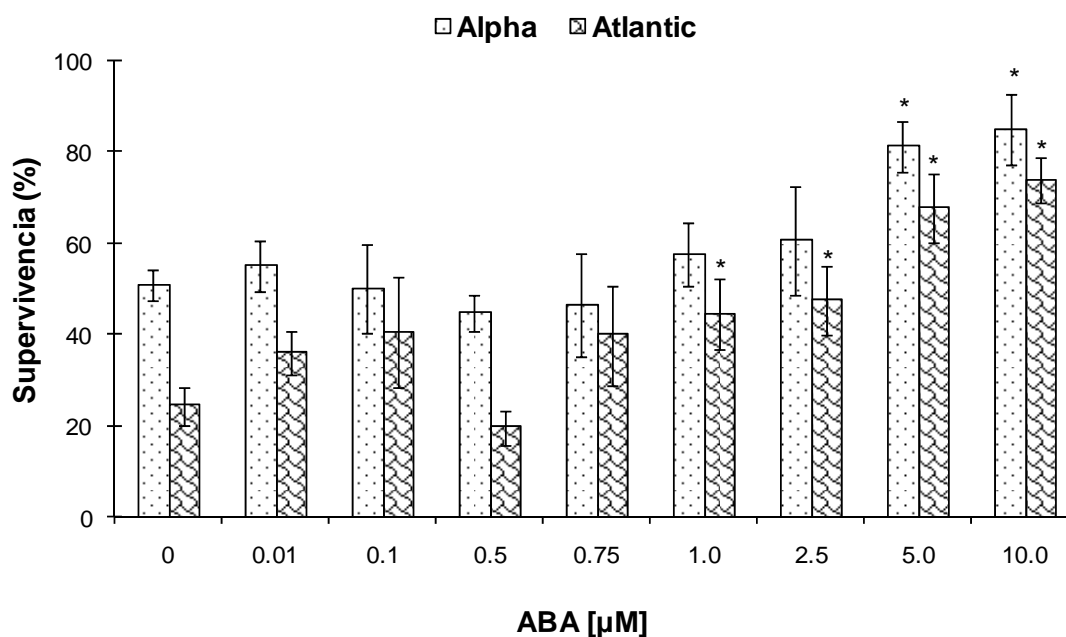


Figura 1. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 4 semanas de cultivo incubadas con diferentes concentraciones de ABA, trasplantadas al suelo y expuestas al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 4-10 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $p < 0.05$).

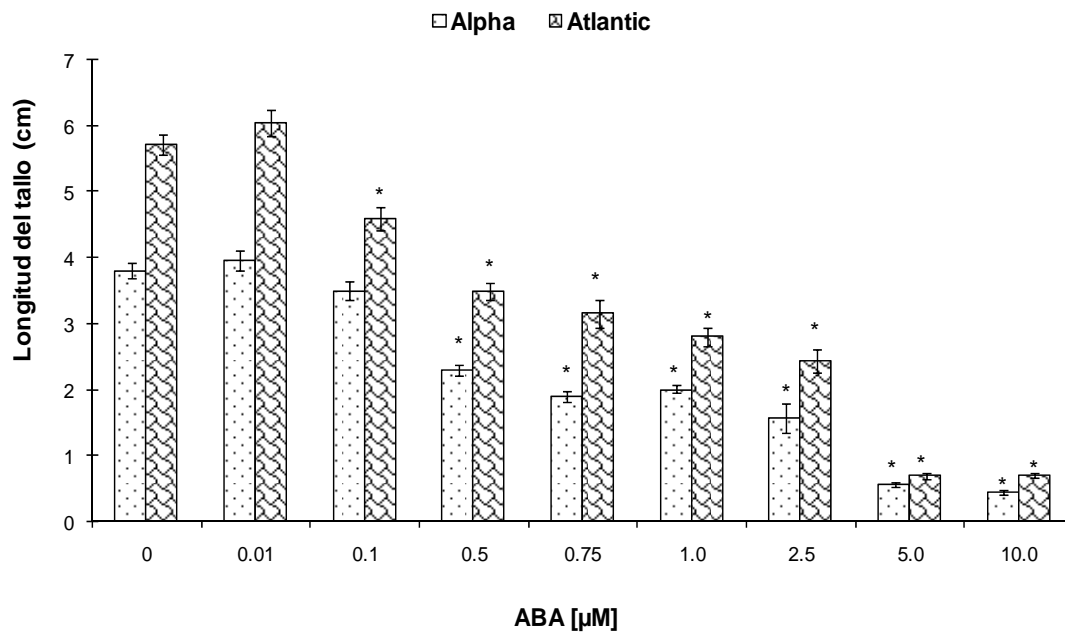


Figura 2. Longitud del tallo de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 4 semanas de cultivo, incubadas en diferentes concentraciones de ABA. Los resultados son el promedio de 36 microplantas \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $p < 0.05$).

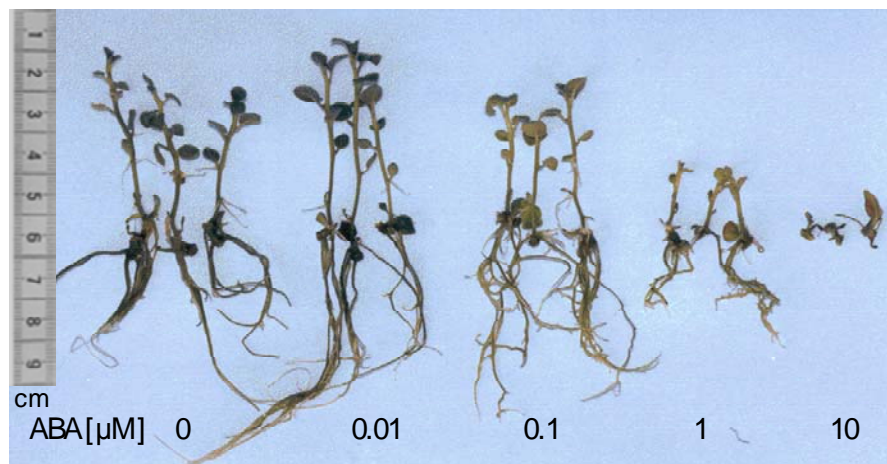


Figura 3. Longitud de tallos y raíces de microplantas de *S. tuberosum* variedad Alpha de 4 semanas de cultivo con diferentes concentraciones de ABA.

4.1.1.1. Supervivencia de microesquejes al frío.

Se utilizaron microesquejes de plantas de papa, para encontrar un modelo de supervivencia al frío en menor tiempo y reproducible, que pudiera ser aplicado a los fenómenos de estudio de esta investigación.

Los microesquejes (provenientes de microplantas de 28 días de edad \pm 2 días) expuestos a diferentes horas al frío ($-6 \pm 1^{\circ}\text{C}$), mostraron que entre 2 y 5 horas de exposición hubo menor supervivencia con respecto a los testigos en ambas variedades, sin llegar a ser letal, mientras que, en los microesquejes expuestos a 6, 7 u 8 horas a frío, la supervivencia fue muy baja, siendo letal para ambas variedades a 8 horas de exposición al frío (Fig. 4). Las respuestas de los microesquejes al trasplante al suelo en condiciones de invernadero fueron inestables por la alta susceptibilidad a las condiciones del trasplante. Como se observó en los microesquejes que no fueron expuestos al frío (testigos), donde la supervivencia solo por efecto del trasplante al suelo disminuyó. En los microesquejes de la variedad Alpha la supervivencia disminuyó un 10.26% y en la variedad Atlantic un 17.72%, resultados que confirma, que la variedad Atlantic es más susceptible al frío que la variedad Alpha (Fig. 4). Por lo que el modelo de microesquejes no se consideró útil para experimentos de inducción de tolerancia en los experimentos subsiguientes.

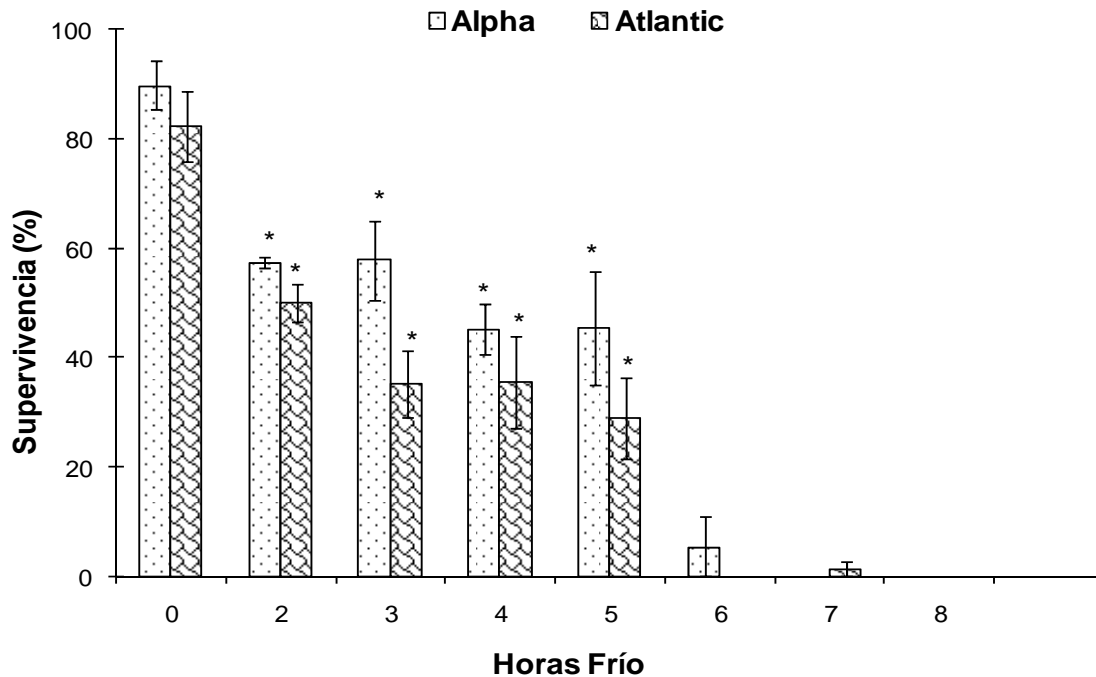


Figura 4. Supervivencia de microesquejes provenientes de microplantas de 28 días de cultivo (± 2 días) de *S. tuberosum* (papa) variedades Alpha y Atlantic, trasplantados al suelo y expuestos al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 0-8 horas. Los resultados son el promedio de 4-10 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $p < 0.05$).

4.1.2. Supervivencia de plantas pretratadas con H_2O_2 .

Estos experimentos se realizaron con el objeto de encontrar la relación entre ABA y H_2O_2 en la posible inducción de tolerancia al frío, propuesta en el objetivo de esta investigación.

4.1.2.1. Supervivencia de microplantas preincubadas con H_2O_2 al frío.

Las preincubaciones en H_2O_2 se realizaron de acuerdo con el método propuesto por López-Delgado *et al.* (1998a), con algunas modificaciones. Se probaron las concentraciones de H_2O_2 0, 5, 15 y 25 mM en microesquejes de papa de las variedades Alpha y Atlantic. Sólo las microplantas de la variedad Alpha provenientes de microesquejes preincubados en la concentración 5 mM de H_2O_2 incrementaron significativamente la supervivencia la cual fue de 46% con respecto al testigo (Fig. 5).

Se realizaron también preincubaciones de H₂O₂ en plantas completas (incluyendo la raíz). Las microplantas de las variedades Alpha y Atlantic de 28 días de edad preincubadas en H₂O₂ 15 mM por 1 hora incrementaron la supervivencia con respecto a los testigos (preincubados en agua); en la variedad Alpha la supervivencia fue de 54.13%, mientras que en la variedad Atlantic fue de 52.98% (Fig. 6).

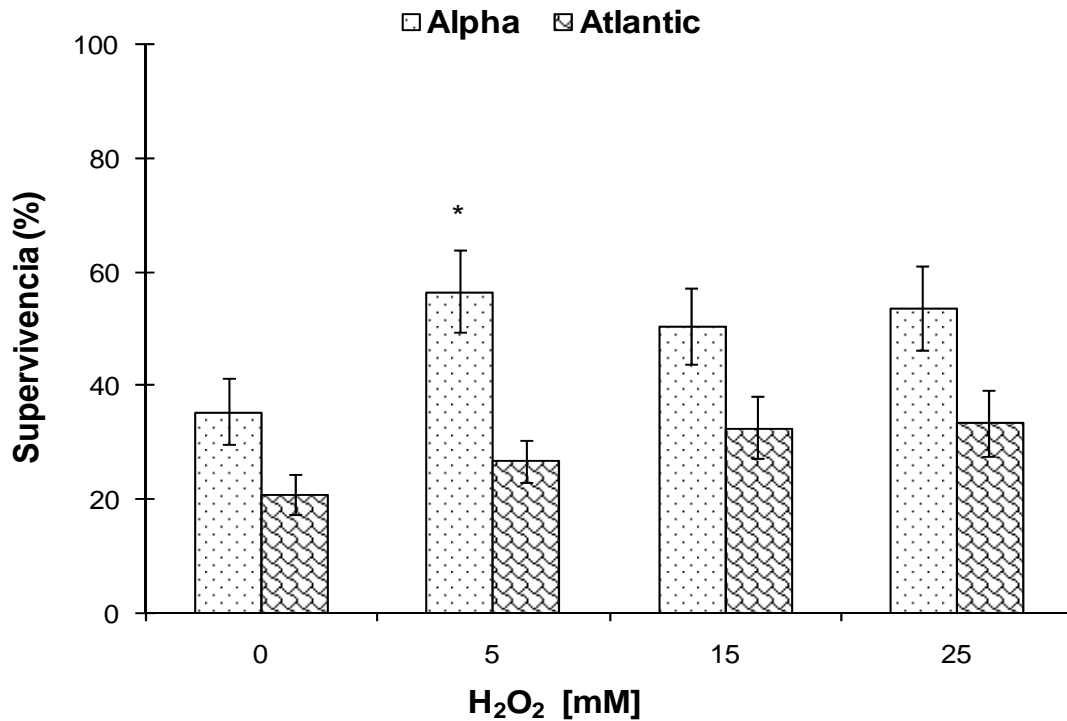


Figura 5. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días en medio MS, provenientes de esquejes preincubados en H₂O₂ durante 1 hora, trasplantadas al suelo y expuestas al frío (-6 ± 1°C) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 4-10 experimentos ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05).

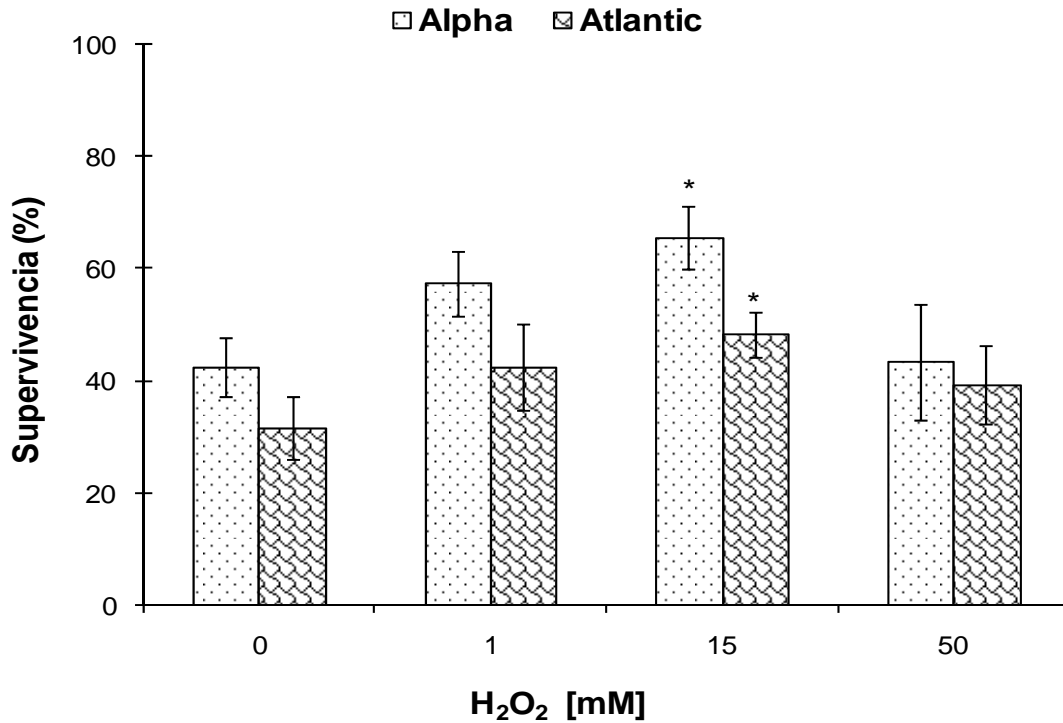


Figura 6. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 28 días de cultivo, preincubadas en H₂O₂ durante 1 hora, trasplantadas al suelo y expuestas al frío (-6 ± 1°C) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 4-10 repeticiones ± e.s; (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05).

4.1.2.1.1. Efecto de las incubaciones de H₂O₂ en microplantas.

Se evaluó que las concentraciones de H₂O₂ utilizadas en este trabajo no fueran letales a las microplantas. Únicamente la concentración 100 mM de H₂O₂ redujo significativamente la supervivencia de la variedad Atlantic, siendo de 50% con respecto al testigo, las otras concentraciones probadas no fueron letales para ambas variedades (Fig. 7).

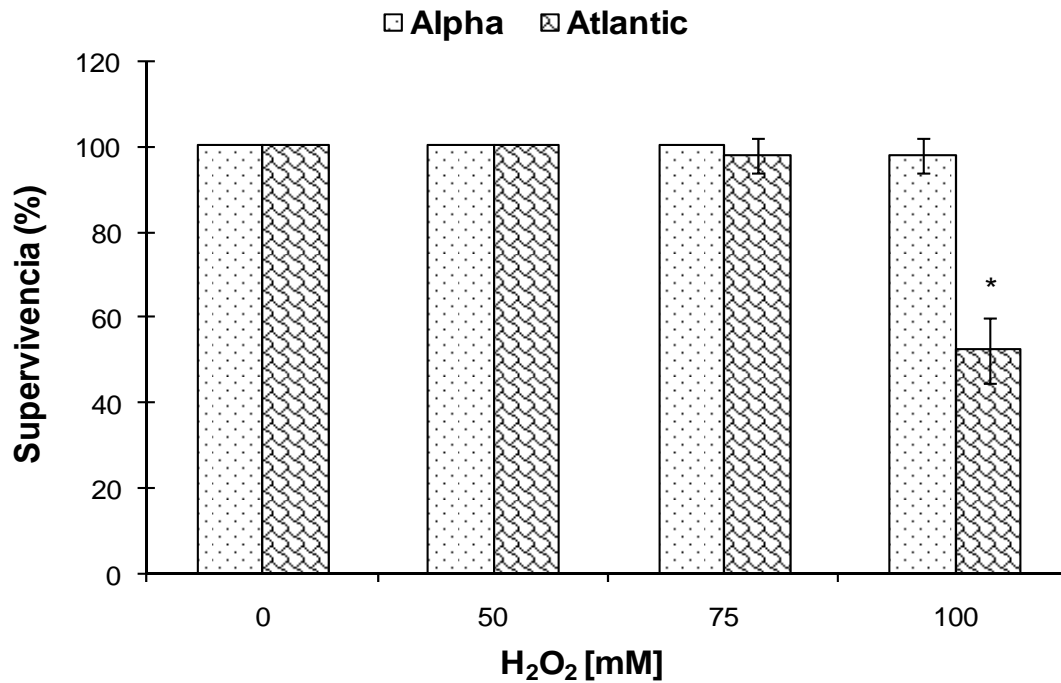


Figura 7. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* variedades Alpha y Atlantic de 28 días de cultivo en medio MS, preincubadas en H₂O₂ durante 1 hora y trasplantadas al suelo. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, p < 0.05).

4.1.2.1.2. Efecto de la inundación (hipoxia-anoxia) en microplantas incubadas en H₂O₂.

En la técnica empleada para incubar en H₂O₂, las microplantas o microesquejes, permanecieron sumergidos en la solución de H₂O₂, lo que ocasionó un tipo de estrés llamado anoxia (falta de oxígeno). Por lo que se estudió el posible efecto de la anoxia en las respuestas de inducción de tolerancia inducidas por el H₂O₂. El efecto de anoxia en plantas completas incrementó la supervivencia significativamente con respecto a los testigos (sin inundación) de ambas variedades. En la variedad Alpha el incremento en la supervivencia fue de 19.2% y en la variedad Atlantic de 17.3% (Fig. 8).

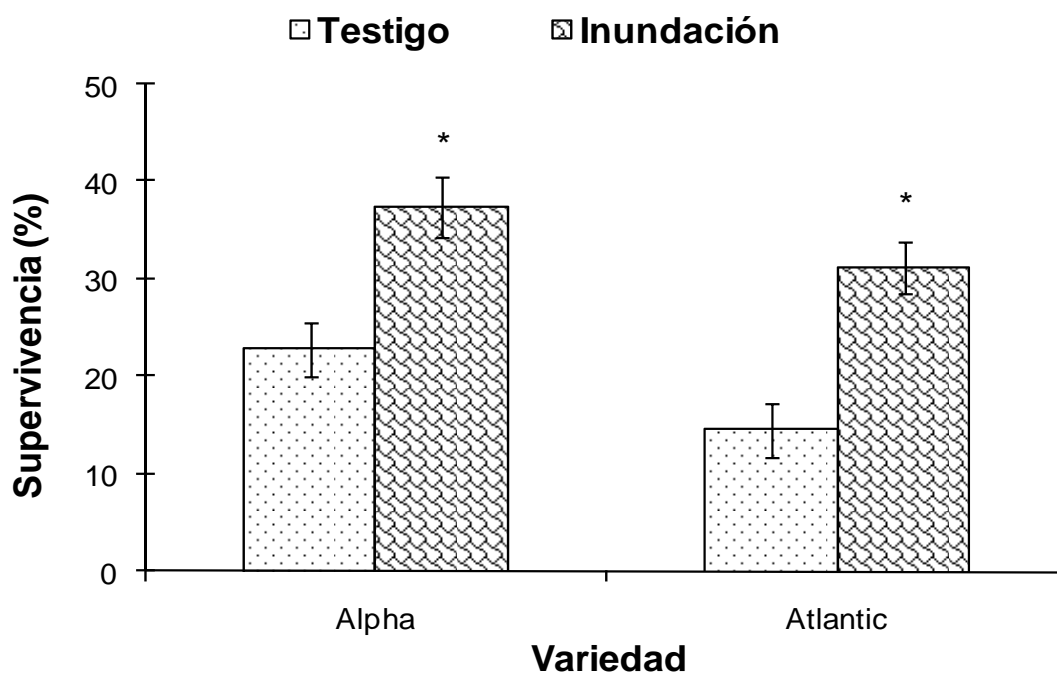


Figura 8. Supervivencia de microplantas de *S. tuberosum* (papa) variedades Alpha y Atlantic de 28 días de cultivo, incubados 1 hora en agua (inundación), trasplantadas al suelo y expuestas al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$) por 4 horas. Después de 15 días se evaluó la supervivencia. Los resultados son el promedio de 6-7 experimentos \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $p < 0.05$).

4.2. Efecto del ABA en las respuestas oxidativas y antioxidativas.

Se cuantificó la actividad enzimática de las enzimas catalasa, ascorbato peroxidasa, peroxidasa y ascorbato oxidasa; y el contenido de ácido ascórbico y de H_2O_2 , en microplantas pretratadas con $10 \mu\text{M}$ de ABA, porque fue la concentración que indujo el mayor porcentaje de supervivencia. Las cuantificaciones de CAT, APX, POX y contenido de H_2O_2 se realizaron en tres etapas:

- a los 28 días de incubación *in vitro* en medio MS con ABA 0 y $10 \mu\text{M}$;
- a las 24 horas después de haber sido trasplantadas al suelo, y
- después de 4 horas de exposición a baja temperatura ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$).

El contenido de ácido ascórbico y la actividad de la ascorbato oxidasa se cuantificaron sólo en la etapa 'a'.

4.2.1. Efecto del ABA en la actividad enzimática de la CAT.

En microplantas de 28 días de incubación con ABA 10 μ M la actividad enzimática de la CAT fue inhibida con referencia a los testigos en ambas variedades (Fig. 9a). Un resultado similar se observó cuando las microplantas fueron trasplantadas al suelo (Fig. 9b), sin embargo, cuando las plantas fueron expuestas 4 horas al frío, la actividad de la catalasa no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de ABA y los testigos (Fig. 9c). La actividad de la catalasa disminuyó en la variedad Alpha un 30.2% y en la variedad Atlantic un 25.65% en el etapa 'a' con respecto a los testigos, mientras en el etapa 'b' la actividad de la catalasa disminuyó en la variedad Alpha 21.1% y en la variedad Atlantic 13.96%. Es destacable mencionar, que los niveles de la actividad de la catalasa en las microplantas tratadas con ABA se mantuvieron sin cambio significativo en las tres etapas evaluadas (Tukey, $p < 0.05$, Figs. 9abc), mientras que en las microplantas no tratadas con ABA de ambas variedades, la actividad de la catalasa disminuyó significativamente después de 4 horas de exposición al frío con respecto a la actividad inicial de la etapa 'a' en ambas variedades (Fig. 9).

La actividad enzimática de la catalasa también fue evaluada en geles nativos de actividad, utilizando microplantas de papa variedad Alpha y Atlantic de 28 días de edad incubadas en ABA 0 y 10 μ M. Se observaron 3 isoenzimas en papa (Fig.10 abc), de las cuales 2 con peso molecular aproximado de 505 y 391 kDa son inhibidas por el tratamiento de ABA (Fig. 10 líneas ab, carriles 2,4,7 y 9) y la de 228 kDa es inducida en ambas variedades con respecto a los testigos (Fig. 10 líneas c, carriles 2,4,7 y 9).

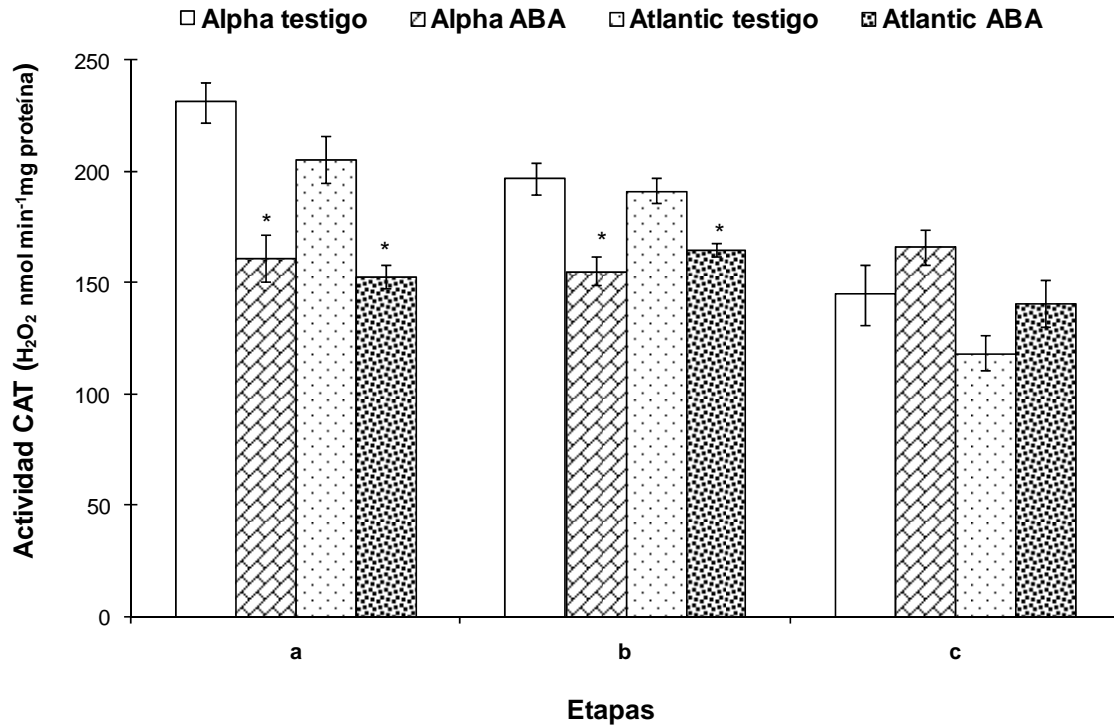


Figura 9. Actividad enzimática de la catalasa de plantas de *S. tuberosum* (papa) de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M, en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo, y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son el promedio de 5-6 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $p < 0.05$).

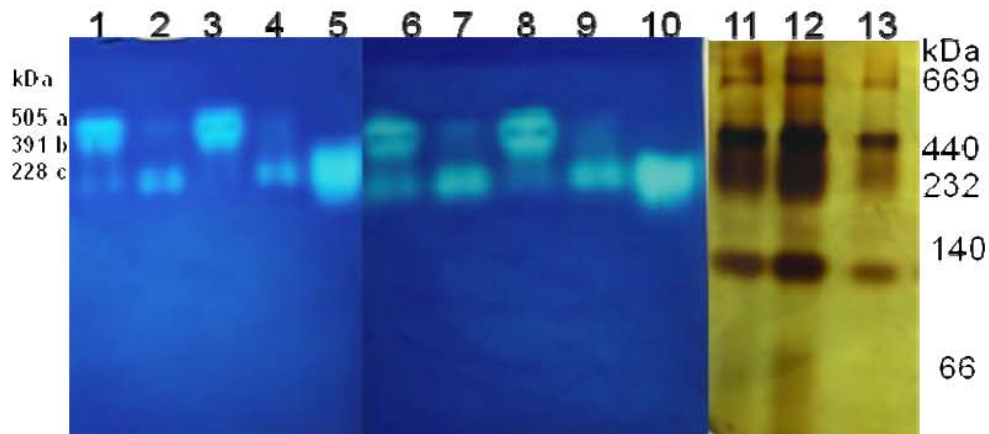


Figura 10. Zimogramas de la actividad enzimática de la catalasa de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μ M. Los números indican el número de carril y las letras las isoenzimas de la catalasa.

- a Isoenzima de la catalasa de peso molecular aproximado 505 kDa
 - b Isoenzima de la catalasa de peso molecular aproximado 391 kDa
 - c Isoenzima de la catalasa de peso molecular aproximado 228 kDa
1. Alpha testigo 40 μ g proteína
 2. Alpha ABA 40 μ g proteína
 3. Atlantic testigo 40 μ g proteína
 4. Atlantic ABA 40 μ l proteína
 5. Marcador 3 μ l (dilución 1:25)
 6. Alpha testigo 50 μ g proteína
 7. Alpha ABA 50 μ g proteína
 8. Atlantic Testigo 50 μ g proteína
 9. Atlantic ABA 50 μ l proteína
 10. Marcador 4 μ l (dilución 1:25)
 11. Marcador 5 μ l (dilución 1:2)
 12. Marcador 10 μ l (dilución 1:2)
 13. Marcador 2 μ l (dilución 1:2)

4.2.2. Efecto del ABA en la actividad enzimática de la APX.

En las microplantas tratadas con ABA 10 μM la actividad enzimática de la APX se incrementó significativamente en las tres etapas cuantificadas, con respecto a los testigos, en ambas variedades (Fig. 11).

La actividad de la APX en la variedad Alpha aumentó un 158% en la etapa 'a', mientras que la variedad Atlantic incrementó un 118% (Fig. 11a). Después de ser trasplantadas al suelo (etapa b) la actividad de la APX incrementó en la variedad Alpha un 93.6% y en la variedad Atlantic un 86.5%. Finalmente, la actividad de la APX al final de la exposición de 4 horas al frío (etapa c) incrementó un 266% en la variedad Alpha y un 122% en la variedad Atlantic (Fig. 11c, Tukey $p < 0.05$).

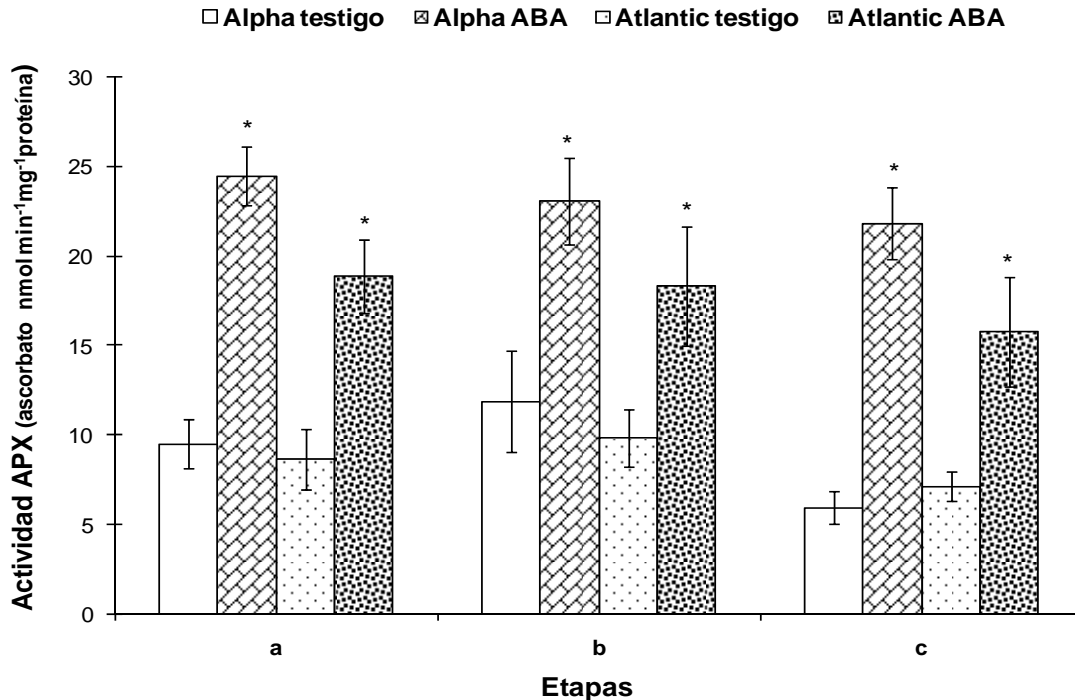


Figura 11. Actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa (APX) de plantas de *S. tuberosum* (papa) de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μM en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo, y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son el promedio de 5-6 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $p < 0.05$).

4.2.3. Efecto del ABA en la actividad enzimática de la POX.

En las microplantas tratadas con ABA 10 μM la actividad enzimática de la POX aumentó significativamente en las tres etapas, con respecto a los testigos (Fig. 12). La actividad POX aumentó un 132.5% en la variedad Alpha y en la variedad Atlantic un 114.2% a los 28 días de cultivo (etapa a, Fig. 12a). Cuando las plantas se trasplantaron al suelo (etapa b, Fig. 12b) la actividad POX incrementó 89.5% en la variedad Alpha y 81.3%, en la variedad Atlantic, y al finalizar la exposición al frío (etapa c) la actividad enzimática de la POX incrementó en la variedad Alpha un 64.37% y en la variedad Atlantic un 66.88% (Fig. 12c). La actividad enzimática de la POX en las microplantas no tratadas, incrementó después de la exposición al frío con respecto a la etapa 'a' (Fig. 12, Tukey $p < 0.05$).

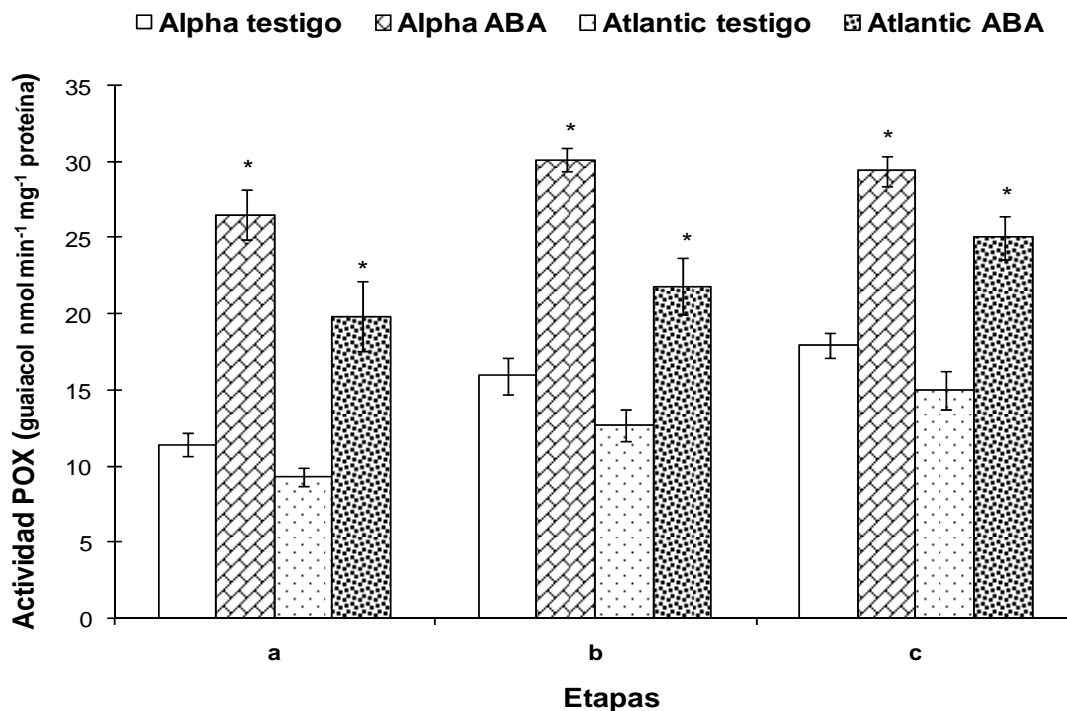


Figura 12. Actividad enzimática de la peroxidasa (POX) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μM , en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío ($-6 \pm 1^\circ\text{C}$). Los resultados son el promedio de 5-6 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

4.2.4. Efecto del ABA en el contenido de H₂O₂.

En las microplantas tratadas con ABA, el contenido de H₂O₂ aumentó en las tres etapas evaluadas, con respecto a los testigos, en ambas variedades. En la variedad Alpha el H₂O₂ incrementó un 26.11% y en la variedad Atlantic un 33.15% en la etapa 'a' (Fig. 13a), en la etapa 'b' incrementó un 31.75% en la variedad Alpha, y un 22.67% en la variedad Atlantic (Fig. 13b), en la etapa 'c' aumentó un 18.53% en la variedad Alpha y un 20.37% en Atlantic, en relación con los respectivos testigos (Fig. 13c). En las plantas no tratadas con ABA el contenido de H₂O₂ aumentó significativamente cuando las plantas fueron expuestas al frío, este incremento fue de un 15% para la variedad Alpha, y para la variedad Atlantic de un 27.2% con respecto al contenido de H₂O₂ de la etapa 'a' (Fig. 13, Tukey, $p < 0.05$).

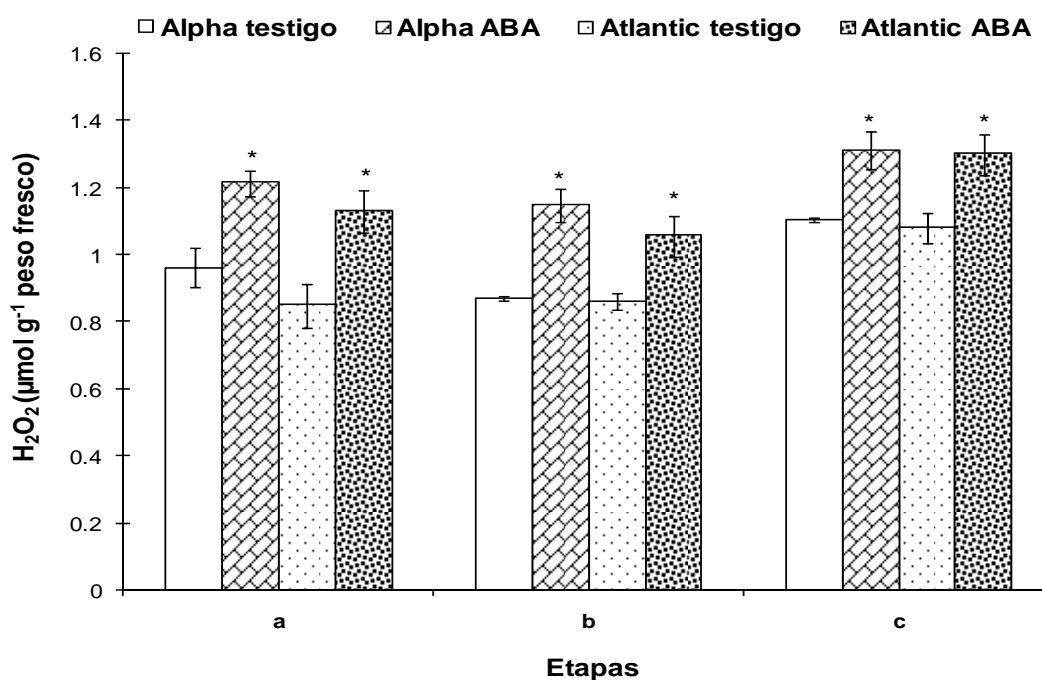


Figura 13. Contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 µM, en tres etapas: a) 28 días de cultivo *in vitro*; b) después de 24 horas del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío (-6 ± 1°C). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

4.2.5. Efecto del ABA en la actividad enzimática de la AO.

En las microplantas tratadas con ABA 10 μM la actividad de la AO incrementó un 65.05% en la variedad Alpha, y en la variedad Atlantic en 46.2%, con respecto a los testigos (Fig. 14).

Cabe destacar que la variedad Atlantic con/sin tratamiento de ABA tuvo menor actividad de las enzimas estudiadas y de contenido de H_2O_2 , en referencia con las microplantas de la variedad Alpha (Figs. 9, 10, 11, 12 y 14).

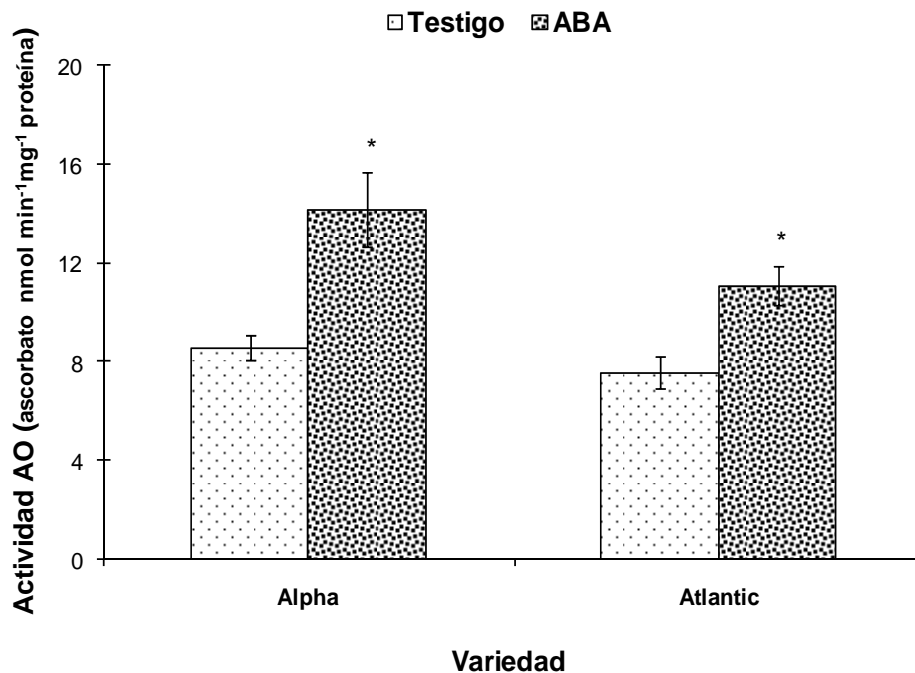


Figura 14. Actividad de la ascorbato oxidasa (AO) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μM por 28 días. Los resultados son el promedio de 6 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

Cabe destacar que la variedad Atlantic con/sin tratamiento de ABA tuvo menor actividad de las enzimas estudiadas y de contenido de H_2O_2 , en referencia con las microplantas de la variedad Alpha (Figs. 9, 10, 11, 12 y 14).

4.2.6. Efecto del ABA en el contenido del AA.

En las microplantas tratadas con ABA 10 μM el contenido total de AA [ácido ascórbico (AA) + dehidroascorbato (DHA)] se incrementó significativamente con respecto a las microplantas no tratadas (Fig. 15). Del AA total, el mayor contenido se encontró en la forma reducida en las microplantas no tratadas, mientras que en las microplantas tratadas con ABA el mayor contenido del AA total se encontró en su forma oxidada (DHA, Tabla 1). Las microplantas de la variedad Atlantic tuvieron mas contenido de AA en comparación con la variedad Alpha (Fig. 15).

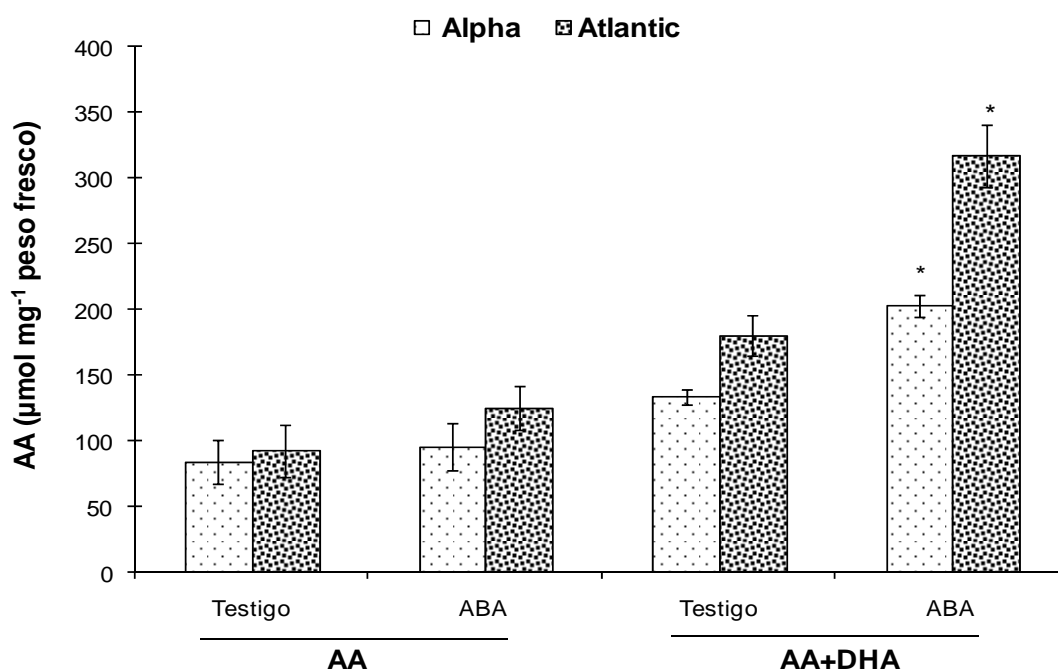


Figura 15. Contenido de ácido ascórbico (AA) y AA total (AA+DHA) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μM . Los resultados son el promedio de 7 repeticiones \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

Tabla 1. Contenido total de ácido ascórbico (AA+DHA), AA (reducido) y DHA (oxidado) de microplantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μM . Los resultados son promedios de 7 repeticiones. Valores con igual letra en la misma columna son estadísticamente similares (Tukey, $P < 0.05$).

	AA+DHA	AA	DHA
Tratamientos	(μmol mg ⁻¹ peso fresco)		
Alpha testigo	134.14a	83.96 (62.59%)a	35.96 (37.41%)a
Alpha ABA	202.95b	95.75 (47.17%)a	107.02 (52.83%)b
Atlantic testigo	180.61a	92.79 (51.37%)a	95.03 (48.73%)a
Atlantic ABA	317.36b	125.2 (39.45%)a	191.3 (60.55%)b

4.3. Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática antioxidante.

En las microplantas incubadas 1 hora en H₂O₂ 15 mM, se midieron las actividades enzimáticas de CAT, APX y POX, por que este tratamiento incrementó significativamente la supervivencia en ambas variedades; con la finalidad de investigar las respuestas antioxidantes en la inducción de tolerancia a baja temperatura por H₂O₂, y conocer si estas respuestas están asociadas a la inducción de tolerancia a baja temperatura por ABA.

4.3.1. Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática de la CAT.

La actividad enzimática de la CAT en microplantas preincubadas 1 hora en H₂O₂ 15 mM, no mostró cambios significativos en relación con los testigos, en ambas variedades, en las 3 etapas evaluadas: preincubación de H₂O₂ 1 hora (etapa a), trasplante al suelo (etapa b) y exposición al frío por 4 horas (etapa c).

En las microplantas de la variedad Atlantic preincubadas en H₂O₂ disminuyó significativamente la actividad enzimática de la CAT, cuando las microplantas fueron trasplantadas a suelo (etapa b) y expuestas a baja temperatura (etapa c, Tabla 2).

Tabla 2. Actividad enzimática de la catalasa (CAT) de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS, en tres etapas: a) 1 hora de incubación en H₂O₂ 15 mM; b) después del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío (-6 ± 1°C). Los resultados son promedios de 3-6 experimentos ± e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P < 0.05).

Actividad enzimática de la catalasa			
Tratamientos	(H ₂ O ₂ nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)		
	a	b	c
Alpha testigo	194.99 ± 7.6a	188.69 ± 12.39a	162.82 ± 16.51a
Alpha pre-H₂O₂	181.85 ± 11.49a	159.92 ± 15.86a	153.61 ± 34.61a
Atlantic testigo	178.89 ± 12.76a	145.89 ± 16.56a	146.58 ± 18.78a
Atlantic pre-H₂O₂	174.80 ± 7.45b	127.92 ± 10.29a	125.50 ± 17.64a

4.3.2. Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática de la APX.

La actividad enzimática de la APX en microplantas preincubadas en H₂O₂ 15 mM 1 hora (etapa a) no tuvo cambios significativos con respecto a los testigos, ni durante el trasplante al suelo (etapa b) y exposición a baja temperatura (etapa c, Tabla 3). Sin embargo, los datos muestran que hubo tendencia a incrementar la actividad enzimática de la APX en ambas variedades, al finalizar el tratamiento de 4 horas al frío (etapa c, Tabla 3).

Tabla 3. Actividad enzimática de la APX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS, en tres etapas: a) 1 hora de incubación en H₂O₂ 15 mM; b) después del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío (-6 ± 1°C). Los resultados son promedios de 3-6 repeticiones ± e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P < 0.05).

Actividad enzimática de la APX			
Tratamientos	(ascorbato nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)		
	a	b	C
Alpha testigo	9.20 ± 2.47a	7.35 ± 1.00a	9.64 ± 3.6 ^a
Alpha pre-H₂O₂	8.10 ± 1.54a	8.93 ± 2.43a	12.28 ± 4.6 ^a
Atlantic testigo	7.26 ± 2.02a	6.00 ± 0.58a	9.22 ± 4.5 ^a
Atlantic pre-H₂O₂	5.06 ± 0.85a	9.12 ± 3.29a	7.88 ± 2.8 ^a

4.3.3. Efecto del H₂O₂ en la actividad enzimática de la POX.

La actividad enzimática de la POX en microplantas de 28 días de cultivo en medio MS e incubadas por 1 hora con H₂O₂ 15 mM (etapa a), trasplantadas al suelo (etapa b) y expuestas al frío (etapa c), no mostró cambios significativos con respecto a los testigos (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad enzimática de la POX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas *in vitro* 28 días en medio MS, en tres etapas: a) 1 hora de incubación en H₂O₂ 15 mM; b) después del trasplante al suelo y c) después de 4 horas de exposición al frío (-6 ± 1°C). Los resultados son promedios de 3-6 experimentos ± e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P < 0.05).

Actividad enzimática POX			
Tratamientos	(guaiacol nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)		
	a	b	c
Alpha testigo	13.11 ± 2.4a	20.53 ± 3.6a	23.72 ± 1.2 ^a
Alpha pre-H₂O₂	10.54 ± 0.78a	21.91 ± 4.4ab	21.23 ± 2.5b
Atlantic testigo	9.72 ± 1.30a	13.58 ± 3.8a	15.22 ± 1.5a
Atlantic pre-H₂O₂	8.12 ± 0.78a	16.69 ± 5.2a	14.56 ± 1.9 ^a

4.4. Efecto del subcultivo sin ABA o trasplante en invernadero de microplantas pretratadas con ABA.

La información de este apartado fue aceptada para su publicación en el artículo:

M. E. Mora-Herrera and H. A. López-Delgado. Freezing tolerance and antioxidant activity in potato microplants induced by abscisic acid treatment. American journal of potato research. (en prensa 2007).

El tratamiento de ABA en microplantas de papa de dos variedades (Fase 1) con diferente sensibilidad al frío, incrementó significativamente la supervivencia con respecto a las microplantas no tratadas (Fig. 1). Sin embargo, el tratamiento de ABA inhibió drásticamente el crecimiento del tallo (Fig. 2) y las raíces (Fig. 3). Debido a esto, se evaluaron las respuestas de estas microplantas en condiciones *in vitro* (Fase 2 *in vitro*) y de invernadero (Fase 2) con la finalidad de conocer los efectos a largo plazo del ABA.

4.4.1. Efecto del subcultivo sin ABA.

Microplantas de papa de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (Fase 1) se subcultivaron a medio MS sin ABA por 28 días más (Fase 2 *in vitro*). Al final de la Fase 2 *in vitro*, las microplantas de ambas variedades pretratadas con ABA (Fase 1) no alcanzaron el tamaño ni el peso de los testigos (Figs. 16 y 17), sin embargo, las microplantas pretratadas en ABA en la Fase 1 tuvieron tasas de crecimiento e incremento de peso en la fase 2 significativamente mayores que las microplantas no tratadas (Figs. 16 y 17).

Las microplantas testigos de la variedad Alpha crecieron 0.62 veces y la variedad Atlantic 0.36 veces al final de la Fase 2 *in vitro*, con una tasa de crecimiento de 8.4% y 7.3% respectivamente (Fig. 16). Mientras que las microplantas de la variedad Alpha tratadas con ABA crecieron 6.9 veces y las de la variedad Atlantic 10.4 veces al final de la Fase 2 *in vitro*, lo que significó una tasa de crecimiento de 10.9% en la variedad Alpha y de 18.5% en la variedad Atlantic (Fig. 16). Respuestas similares se observaron en el peso fresco de las microplantas al final de la Fase 2 *in vitro* (Fig. 17). Las microplantas no pretratadas con ABA de la variedad Alpha incrementaron su peso en 0.41 veces con respecto al peso de la Fase 1 y la variedad Atlantic en 0.49 veces. Por el contrario, las microplantas tratadas con ABA en la Fase 1, incrementaron en 6.7 veces en la variedad Alpha y en 6.2 veces en la variedad Atlantic, al final de la fase 2 *in vitro* (Fig. 17).

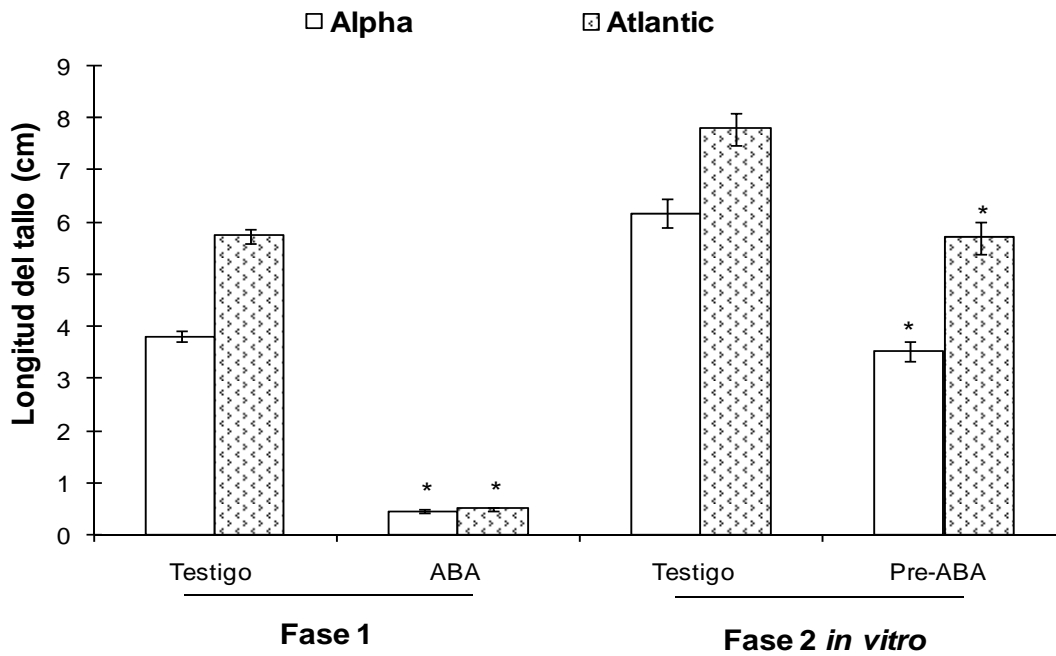


Figura 16. Longitud del tallo de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1), y después subcultivadas por otros 28 días a medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 48 microplantas \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

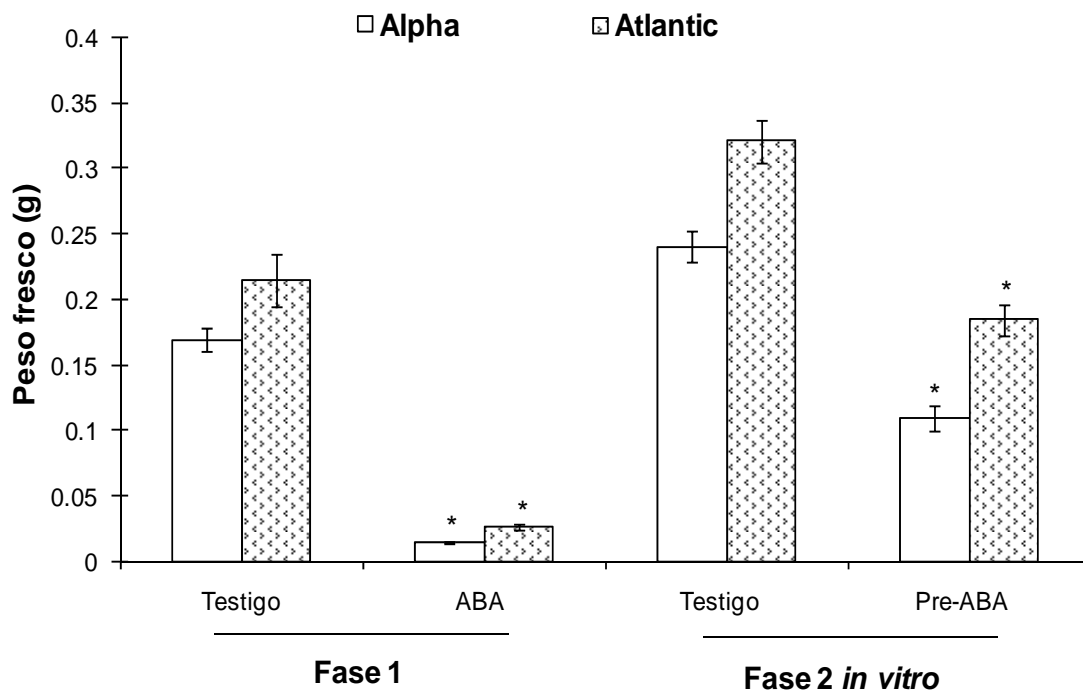


Figura 17. Peso fresco de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días en medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 48 microplantas \pm e.s. (*) Diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

4.4.1.1. Efecto del subcultivo sin ABA en las actividades enzimáticas de CAT, APX y POX, y contenido de H_2O_2 .

Efecto del subcultivo sin ABA en la actividad enzimática de la CAT

En microplantas tratadas con ABA 10 μ M (Fase 1) la actividad enzimática de la CAT disminuyó significativamente en relación con las microplantas no tratadas en ambas variedades (Figs. 9a, 10, 18 Fase 1). La actividad de la catalasa en la variedad Alpha disminuyó un 30.2% y en la variedad Atlantic un 25.65%. Sin embargo, al final de la Fase 2 *in vitro*, la actividad enzimática de la CAT fue significativamente igual entre plantas pretratadas (Fase 1) y testigos, en ambas variedades (Fig. 18, Fase 2 *in vitro*).

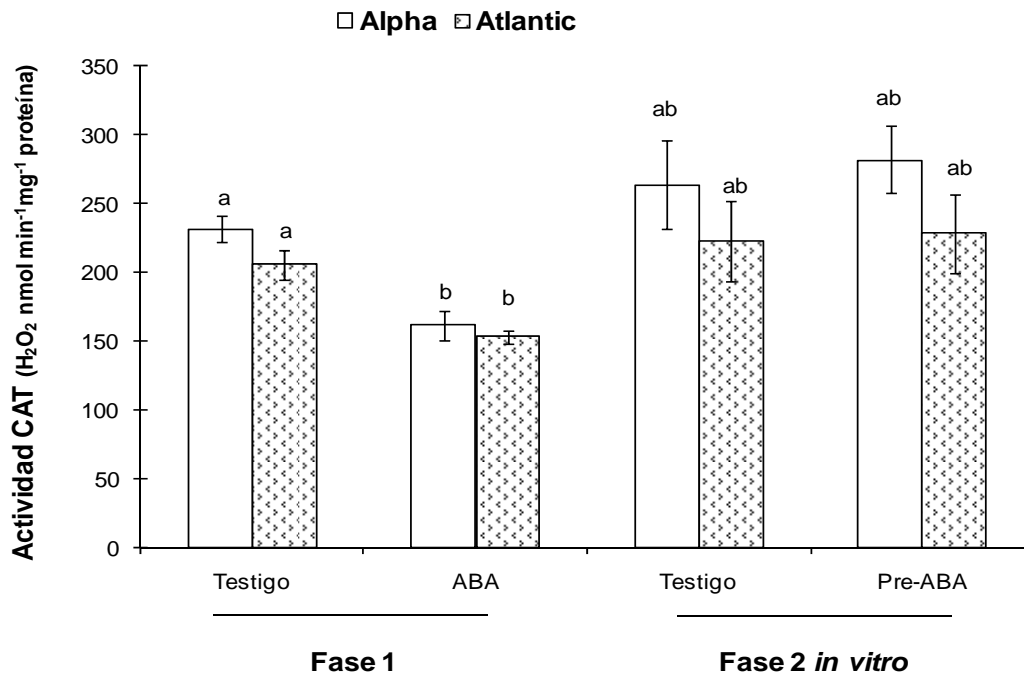


Figura 18. Actividad enzimática de la catalasa de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μM ("Pre-ABA", Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días a medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

Efecto del subcultivo sin ABA en la actividad enzimática de la APX

En microplantas tratadas con ABA 10 μM (Fase 1) la actividad enzimática de la APX aumentó significativamente en relación con los testigos de ambas variedades (Figs. 11a, 19 Fase 1). En la variedad Alpha la actividad de la APX incrementó 1.6 veces y en la variedad Atlantic 1.2 veces (Fig. 11a). Sin embargo, al final de la Fase 2 *in vitro*, la actividad enzimática de la APX fue significativamente igual entre plantas pretratadas (Fase 1) y testigos, en ambas variedades (Fig. 19, Fase 2 *in vitro*).

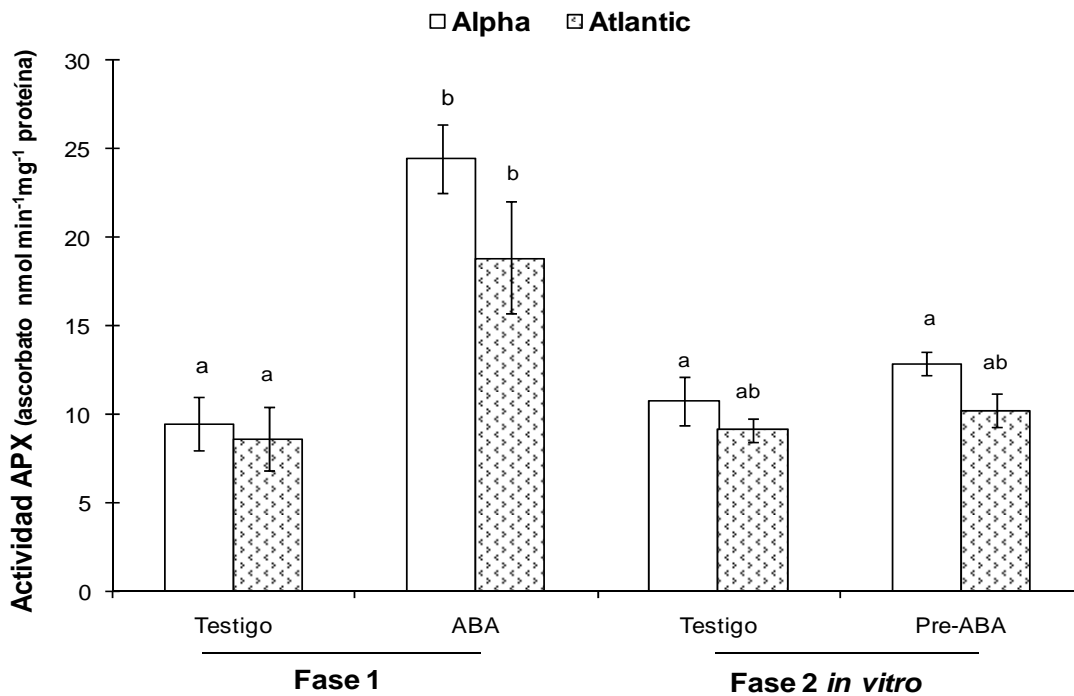


Figura 19. Actividad enzimática de la APX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 (testigo) y 10 μM ("Pre-ABA", Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días a medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

Efecto del subcultivo sin ABA en la actividad enzimática de la POX

En microplantas tratadas con ABA 10 μM (Fase 1) la actividad enzimática de la POX incrementó significativamente con respecto a los testigos, de ambas variedades (Figs. 12a, 20 Fase 1). La actividad POX aumentó en 1.3 veces en la variedad Alpha con respecto al testigo y en 1.1 veces en la variedad Atlantic. Sin embargo, al final de la Fase 2 *in vitro*, la actividad enzimática de la POX fue significativamente igual entre plantas pretratadas (Fase 1) y testigos en ambas variedades (Fig. 20, Fase 2 *in vitro*).

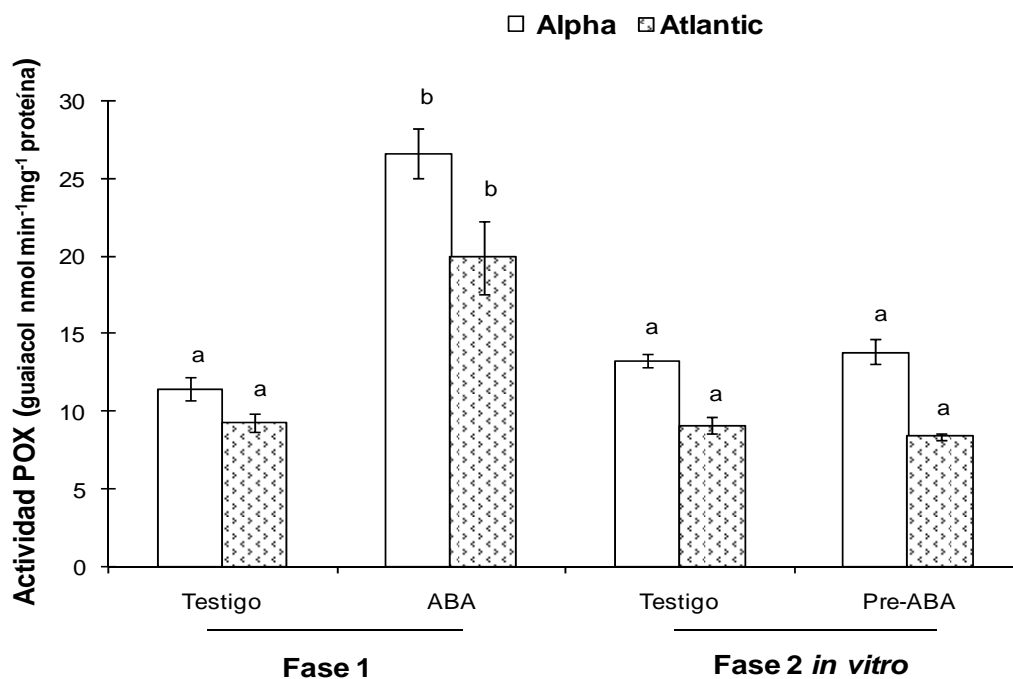


Figura 20. Actividad enzimática de la POX de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (“Pre-ABA”, Fase 1) y después subcultivadas 28 días más en medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

Efecto del subcultivo sin ABA en el contenido de H₂O₂

En microplantas de papa de las variedades Alpha y Atlantic tratadas con ABA 10 μ M (Fase 1) el contenido de H₂O₂ aumentó significativamente en relación con los testigos (ABA 0 μ M) de ambas variedades (Figs. 13a, 21, Fase 1). En la variedad Alpha del contenido de H₂O₂ incrementó 26% y en la variedad Atlantic 33.15 veces (Fig. 13a). Sin embargo, al final de la Fase 2 *in vitro*, el contenido de H₂O₂ fue significativamente igual entre plantas pretratadas (Fase 1) y testigos en ambas variedades (Fig. 21, Fase 2 *in vitro*).

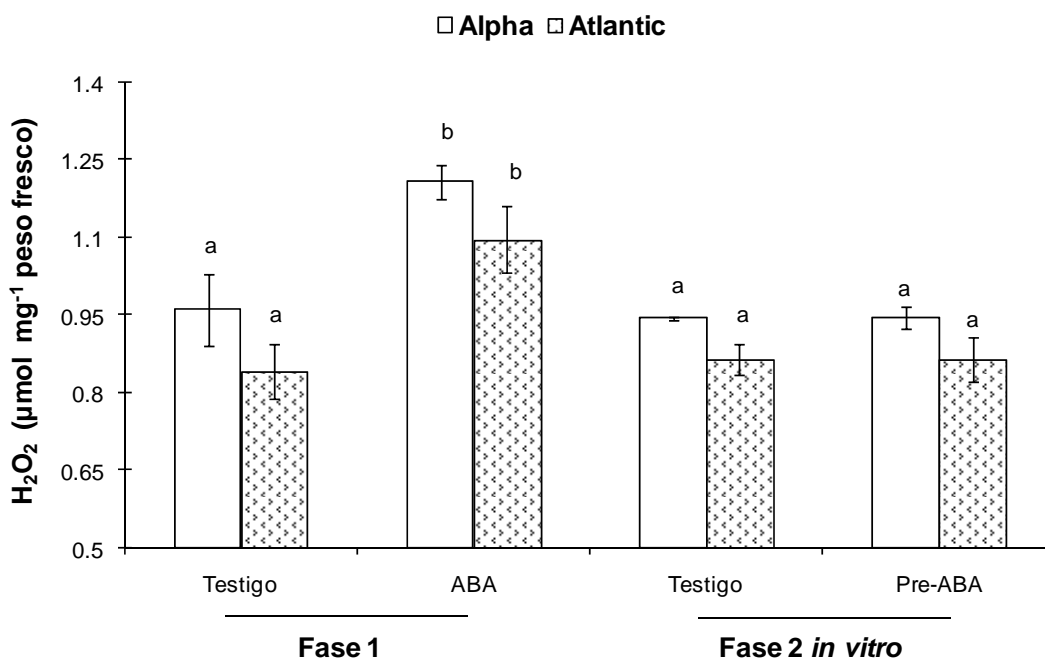


Figura 21. Contenido de H_2O_2 de plantas de *S. tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas 28 días *in vitro* en medio MS con ABA 0 y 10 μM ("Pre-ABA", Fase 1) y después subcultivadas por otros 28 días en medio MS sin ABA (Fase 2 *in vitro*). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm e.s. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

4.4.2. Efecto del trasplante en condiciones de invernadero de microplantas pretratadas con ABA.

Las microplantas de papa de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas en ABA 0, 10 μM durante 28 días (Fase 1) se trasladaron a condiciones de invernadero por 120 días (Fase 2). Después de 30 días del trasplante, las plantas pretratadas y no tratadas con ABA (Fase 1) no mostraron diferencias significativas en el crecimiento (tamaño similar, Anexo 4). Lo que confirmó la acelerada tasa de crecimiento de las plantas pretratadas en ABA (Fase 1) mostrada en la Fase 2 *in vitro* (Fig. 16 Fase *in vitro*). A los 100 días del trasplante se midieron y se pesaron las plantas pero no hubo diferencias significativas entre las plantas pretratadas y las no tratadas con ABA de la Fase 1. La cosecha se realizó a los 120 días del trasplante y se evaluó el número y peso de

tubérculos por planta, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas que fueron tratadas y no tratadas con ABA en la Fase 1. El porcentaje de brotación de los tubérculos se evaluó 3 meses después de la cosecha y tampoco hubo diferencias significativas las plantas pretratadas (Fase 1) y las testigos en ambas variedades (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de plantas de papa de las variedades Alpha y Atlantic cultivadas en condiciones de invernadero por 120 días. Las plantas se incubaron previamente en condiciones *in vitro* 28 días en medio MS con ABA 0 y 10 μ M (Pre-ABA, Fase 1). Los resultados son el promedio de 48 plantas por tratamiento. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

	<i>Alpha</i>		<i>Atlantic</i>	
	Testigo	pre-ABA	Testigo	pre-ABA
<i>Longitud del tallo (cm)</i>	87.6 \pm 2.1a	83.8 \pm 2.9a	65.7 \pm 2.9a	61.3 \pm 2.2a
<i>Peso seco de la planta (g)</i>	5.0 \pm 0.15a	4.9 \pm 0.18a	2.3 \pm 0.17a	2.4 \pm 0.13a
<i>Número de tubérculos por planta</i>	5.1 \pm 0.25a	4.6 \pm 0.25a	4.1 \pm 0.26a	3.9 \pm 0.17a
<i>Peso de los tubérculos por planta (g)</i>	28.8 \pm 1.6a	27.5 \pm 1.5a	27.3 \pm 1.3a	26.3 \pm 1.4a
<i>Porcentaje de brotación (%)</i>	100 \pm 0a	98.2 \pm 1.2a	100 \pm 0a	100 \pm 0a

V. DISCUSIÓN

En este trabajo se investigaron los efectos de diferentes concentraciones de ABA y H₂O₂ en la tolerancia a baja temperatura en microplantas de papa (*S. tuberosum*) de dos variedades con diferente sensibilidad al frío (Mora, 2002; Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora y López, 2006) en relación al estrés oxidativo y su respuesta antioxidante.

5.1. Efecto del ABA en la inducción de tolerancia al frío.

El tratamiento 10 µM de ABA incrementó significativamente la tolerancia al frío en microplantas de papa de las variedades Alpha y Atlantic con respecto a los testigos (Fig. 1), aunque, la variedad Atlantic fue más sensible a la baja temperatura tuvo incremento significativo de supervivencia en 4 tratamientos de ABA, mientras, la variedad Alpha solo en 2. En este trabajo se confirmó que la variedad Atlantic es más sensible al frío que la variedad Alpha.

El tratamiento de ABA 10 µM incrementó más la supervivencia en la variedad Atlantic que en la variedad Alpha, siendo ésta de 204% y 66.73% respectivamente, con referencia a los testigos (Fig. 1). Estas diferencias en las respuestas de las plantas de papa ya habían sido observadas, en donde la variedad Atlantic en determinadas condiciones de exposición al frío y tratamiento de H₂O₂, incrementó la supervivencia, mientras que la variedad Alpha no tuvo diferencias significativas con respecto al testigo (Mora-Herrera *et al.*, 2005). Cambiando tiempo de exposición a baja temperatura y diferente concentración de preincubación de H₂O₂ las dos variedades incrementaron significativamente la tolerancia a dicho estrés (Mora y López, 2006). Estas respuestas en la inducción de tolerancia a estrés son muy importantes en los programas de manejo integrado de cultivos y en el sistema de producción de semilla “*in vitro*-invernadero-campo” ya que son potencialmente aplicables a todos los cultivos para favorecer a variedades sensibles a estrés que tienen características agronómicas importantes.

Por otro lado, la participación del ABA en la tolerancia al frío es un proceso complejo que comprende cambios fisiológicos y morfológicos directamente involucrados con la aclimatación a dicho estrés (Chen *et al.*, 1983; Mäntylä *et al.*, 1995; Tamminen *et al.*, 2001). Se ha encontrado que los estímulos de baja temperatura pueden ser sustituidos

por aplicaciones exógenas de ABA, resultando en un incremento en la tolerancia al frío, o lo que se conoce como aclimatación y/o tolerancia cruzada (Chen *et al.*, 1983; Tamminen *et al.*, 2001). Así, en la papa (*S. commersonii*) concentraciones de ABA 3.78 a 113.5 μM inducen aclimatación a temperaturas de congelamiento (-3.3 a -8.4°C; Tseng y Li, 1991) y en la variedad Red Pontiac de *S. tuberosum*, que presenta dificultad para ser aclimatada con pre choques de baja temperatura, el ABA también indujo aclimatación a temperaturas de congelamiento (Chen *et al.*, 1983). Dicho efecto de aclimatación a frío inducido por ABA también ha sido observado en otras especies tales como: maíz (Anderson *et al.*, 1994,1995), trigo (Chen y Gusta, 1983), cebada (Bravo *et al.*, 1998), *Arabidopsis* (Mäntylä *et al.*, 1995; Tamminen *et al.*, 2001), *Physcomitrella* (Minami *et al.*, 2003) y en el tabaco (Pospisilova *et al.*, 1999). Inclusive, la tolerancia a frío de algunas especies como, plántulas de maíz está asociada a la acumulación endógena de ABA (Janowiak *et al.*, 2002). El ABA también se ha encontrado que disminuye los daños ocasionados por bajas temperaturas como se reportó en plántulas de sandía (Korkmaz, 2002).

El tratamiento con ABA indujo un severo estrés (sin ser letal), por la significativa inhibición del crecimiento mostrada en ambas variedades con respecto a los testigos (Fig. 2 y 3), esto posiblemente llevó o indujo a la aclimatación al frío y tal vez indujo tolerancia cruzada (resistencia inducida a cualquier forma de estrés biótico y abiótico).

En la aclimatación de plantas es muy importante la intensidad de un estrés previo, en este caso las microplantas de papa estuvieron en estrés continuo por 28 días con ABA, por lo que posiblemente se indujo aclimatación al frío y a otros tipos de estrés. Un hecho importante fue que las microplantas tratadas con ABA y trasplantadas a suelo crecieron más vigorosas que los testigos y no mostraron daño por el tratamiento al frío como los testigos (Anexo 4).

No se sabe exactamente cómo el ABA induce inhibición en el crecimiento (Sharp y LeNoble, 2002) pero muchos factores están involucrados. Parece ser que el ABA induce esta inhibición vía interacción con el etileno, como se encontró en estudios con plantas de maíz (Spollen *et al.*, 2000) y tomate (Sharp *et al.*, 2000), sugiriendo que el ABA induce cambios en la concentración de etileno y esto incide en la regulación del crecimiento. En contraparte Grossmann y Hansen (2001), encontraron que el etileno

dispara un incremento en la producción de ABA y que éste actúa como mensajero secundario que lleva a la inhibición del crecimiento, por lo que la interacción hormonal en las plantas es muy compleja y aún no es del todo clara la función de estas interacciones en el crecimiento de las plantas.

El ABA es una fitohormona que induce adaptación y tolerancia al estrés, existen evidencias donde tratamientos de ABA inducen tolerancia al frío. Como ha sido reportado en células en suspensión: de trigo (Chen y Gusta, 1983), de maíz y de *S. commersonii* (Xin y Li, 1993a) y en plantas de *Bromus inermis* (Robertson *et al.*, 1994), *Arabidopsis* (Mäntylä *et al.*, 1995; Tamminen *et al.*, 2001), maíz (Anderson *et al.*, 1994, 1995), y en el musgo *Physcomitrella* (Minami *et al.*, 2003). También, la tolerancia al frío ha sido asociada al incremento endógeno de los niveles de ABA, como se reportó en plántulas de maíz, donde se observó que está asociada a la habilidad de la planta para acumular rápidamente y en altas concentraciones ABA, lo que protege a las membranas y evita las lesiones necróticas ocasionadas por el frío, concluyendo que las variedades más sensibles acumulan menos ABA que las tolerantes al frío (Janowiak *et al.*, 2002, 2003). Similarmente, se ha encontrado que la concentración de ABA endógena se incrementa durante la aclimatación al frío en varias especies de plantas tales como la papa (Chen *et al.*, 1983; Tseng y Li, 1991), alfalfa (Mohapatra *et al.*, 1988), trigo (Lalk y Dörffing, 1985) y cebada (Bravo *et al.*, 1998).

Esta bien documentado que el ABA participa en la inducción de tolerancia a bajas temperaturas, tanto a temperaturas de frío (0 a 15°C) como temperaturas de congelamiento (menores a 0°C), aunque, el grado de daño ocasionado por bajas temperaturas va a depender de la especie (Thomashow *et al.*, 1998).

El cómo el ABA induce tolerancia a frío no está bien establecido (Xin y Li, 1993b), sin embargo, se han propuesto, dos posibles mecanismos; manteniendo un adecuado balance hídrico y por inducción de la expresión de genes específicos de defensa que protegen contra el daño originado por las bajas temperaturas (Bravo *et al.*, 1998).

Ante temperaturas de congelamiento se incrementa la concentración de ABA en las plantas y hay producción de osmólitos (Bravo *et al.*, 1998), durante las temperaturas de congelamiento, primero se congelan los compartimentos extracelulares reduciendo el potencial hídrico lo que lleva a una baja de agua de la célula ocasionada por ósmosis,

entonces el daño principal ocasionado por temperaturas bajas extremas es la deshidratación (Browse y Xin, 2001). Por lo que se ha propuesto que el ABA y la prolina, que se inducen ante estrés por sequía pueden asociarse para inducir tolerancia a frío (Xin y Li, 1993b).

Otro hecho que respalda la evidencia de que el ABA protege del daño a bajas temperaturas por el mismo sistema que la de estrés osmótico, es que se encontró que la inducción de los factores de transcripción CBR/DREB1 (elementos que responden a la deshidratación) también son inducidos tanto por frío como por ABA, esta proteína induce tolerancia a temperaturas de congelamiento y sequía lo que puede explicar que la tolerancia a frío está relacionada con la sequía en *Vitis riparia* y *V. vinifera* (Xiao *et al.*, 2006). Por lo que en esta investigación no se descarta que la inducción de tolerancia a baja temperatura en las microplantas de papa sea por la interacción de muchas respuestas inducidas por ABA.

5.2. Efecto del ABA en las respuestas oxidativas y antioxidativas.

Se ha encontrado que el ABA induce la expresión de numerosos genes relacionados con la protección al frío. Así, el ABA y el frío indujeron la proteína RAB18 (responde a ABA, Mäntylä *et al.*, 1995), un gen promotor *RD29A-LUC* que responde al estrés en *Arabidopsis* (Xiong *et al.*, 1999) y se encontraron 9 cDNAs inducidos que responden a ABA y que inducen tolerancia a temperaturas de congelamiento en células en suspensión de *Bromus inermis* (Lee y Chen, 1993). El ABA también, indujo: la expresión de ABR17 cDNA (responde a ABA) que confiere múltiple tolerancia a estrés incluido el frío en *Arabidopsis* (Srivastava *et al.*, 2006); la expresión de 11 genes asociados a la tolerancia a bajas temperaturas en células en suspensión de maíz (Xin y Li, 1993b), y la inducción de los genes *Cor* y *Lea* en trigo (Kobayashi *et al.*, 2007). En general el ABA es una fitohormona muy importante que regula muchos procesos metabólicos induciendo cambios en la expresión génica, se han identificado 1354 genes que son regulados por ABA, muchos de ellos codifican para los componentes de transducción de señales (Hoth *et al.*, 2002), y en *S. tuberosum* el tratamiento de ABA 100 μ M asperjado durante 15 días indujo la proteína CDS34 que es sintetizada en

respuesta a déficit de agua y que además se induce ante otros tipos de estrés como bajas temperaturas (Pruvot *et al.*, 1996).

En la tolerancia al frío inducida por ABA en microplantas de papa, es posible, que haya existido una serie de cambios en la expresión genética que llevaron a la aclimatación y/o tolerancia que incluyó a las proteínas relacionadas con el estrés osmótico (Thomashow, 1998) y algunas otras reportadas en la literatura (Bray *et al.*, 2000), que no se estudiaron en este caso pero que no podemos descartar que hayan participado en la inducción de tolerancia al frío mediada por ABA.

Se ha encontrado también, que el ABA induce el incremento en los niveles de antioxidantes en las respuestas de tolerancia (Anderson *et al.*, 1994; Guan y Scandalios, 1998ab; Gong *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2005; Jiang y Zhang 2002acb; Jiang y Zhang, 2003). De ahí, que el objetivo principal de este trabajo fue investigar si la inducción de tolerancia a baja temperatura inducida por ABA en microplantas de papa, estaba asociada al estrés oxidativo y a la respuesta antioxidante, considerando, que la tolerancia inducida por ABA está asociada a cambios en la actividad de enzimas antioxidantes en diferentes tipos de estrés (Prasad *et al.* 1994b; Gong *et al.* 1998; Jiang y Zhang 2001; Jiang y Zhang 2002b; Zhou *et al.*, 2005b; Hu *et al.*, 2005) incluyendo las bajas temperaturas (Zhou *et al.*, 2005a). Inclusive, la aclimatación a frío está asociada al incremento de enzimas antioxidantes y contenido de H₂O₂ como se reportó en la aclimatación a frío de plantas de maíz (Kingston-Smith *et al.*, 1999).

El tratamiento de 10 µM de ABA en microplantas de papa de las variedades Alpha y Atlantic de 28 días de edad incrementó significativamente la actividad enzimática de APX (Fig. 11), POX (Fig. 12) y AO (Fig. 14), así, como el contenido de H₂O₂ (Fig. 13) y AA (Fig. 15), y disminuyó la actividad enzimática de la catalasa (Figs. 9 y 10) con respecto a los testigos.

5.2.1. Efecto del ABA en la actividad enzimática de la CAT.

En microplantas de papa incubadas en 10 µM de ABA la actividad enzimática de la catalasa disminuyó significativamente con respecto a las no tratadas (Fig. 9a), esta respuesta inducida por ABA fue muy importante ya que, este es el primer reporte que se

tiene conocimiento donde, la actividad enzimática de la CAT se inhibe por efecto del ABA, son muchos los reportes donde tratamientos de ABA incrementan la actividad enzimática de la catalasa por ejemplo, se encontró que la inducción a termotolerancia inducida por ABA esta asociada a un incremento en la actividad de la CAT y otras enzimas antioxidantes (Gong *et al.*, 1998). Por su parte Zhou *et al.* (2005a), reportaron también que el ABA induce la actividad de la catalasa después de la exposición a frío previo un tratamiento con ABA en *Stylosanthes guianensis*. Inclusive, en algas el ABA induce incremento en la actividad de la catalasa (Yoshida *et al.*, 2003). Guan y Scandalios (1998a), también encontraron un incremento en la actividad catalasa por efecto del ABA y estrés osmótico en plántulas de maíz. La misma respuesta fue reportada por Jiang y Zhang (2001), con el tratamiento de ABA 10 μM en plántulas de maíz, cabe mencionar que esta misma dosis fue utilizada en este trabajo en las microplantas de papa pero por 28 días continuos, mientras que en las plántulas de maíz fue de 24 horas.

La inhibición de la actividad de la catalasa inducida por ABA en microplantas de papa fue confirmada en geles nativos (Fig. 10) en los cuales, además, se encontraron 3 isoenzimas, de las cuales Niebel *et al.*, (1995) reportaron la Cat2; y recientemente se reportó la Cat1 y Cat2 por Santos *et al.*, (2006). A pesar de esto las isoenzimas encontradas en los zimogramas de microplantas de papa tratadas con ABA 0 y 10 μM no están caracterizadas ya que no existe información al respecto. En los zimogramas se observó que el tratamiento de ABA inhibió la actividad enzimática de las isoenzimas de peso molecular aproximado de 505 y 391 kDa e indujo la de 228 kDa (Fig. 10), sin embargo, esta inducción no fue significativa cuando se cuantificó la actividad de la catalasa por espectrofotómetro (Fig. 9). Existen evidencias donde el ABA induce la expresión de genes de catalasa y otras enzimas antioxidantes (Gong *et al.*, 1998; Guan y Scandalios 1998a; Guan *et al.*, 2000). Por otro lado, la clasificación exacta de estas isoenzimas de catalasa en papa no ha sido bien documentada y, aunque las catalasas son muy conservadas (Willekens *et al.*, 1995), la clasificación actual cambia para cada especie y esta ha sido identificada a nivel de expresión y no de actividad (Willekens *et al.*, 1995; Niebel *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2006). Aunado a esto, la función específica de cada isoenzima de catalasa en cada especie no es clara (Santos *et al.*, 2006). Es

necesario por lo tanto continuar en esta línea de investigación para esclarecer la información aquí obtenida acerca de las isoenzimas de catalasa encontradas en papa.

Con respecto a los transcritos de las 3 clases de *CAT* se ha encontrado que también son inducidos por ABA. Por ejemplo, aplicaciones exógenas de ABA significativamente incrementaron la expresión de *Cat1*, debido a la respuesta en la transcripción ABRE2 sobre el promotor *Cat1* que es responsable de la inducción de *Cat1* por ABA. Además se muestra que el ABA induce la expresión de *Cat1* vía la interacción de ABRE2 y la proteína que se liga CBF1 (Factor de ligación *Cat1*). Los datos muestran que el H₂O₂ es un importante intermediario en la transducción de señales del ABA llevando a la expresión de *Cat1* en maíz, también se reportó que el H₂O₂, induce *Cat1* y que es similar a la respuesta con ABA (Guan *et al.*, 2000). Por su parte, Guan y Scandalios (1998a), encontraron que cada gen de catalasa responde diferencialmente a ABA en diferentes estadios del desarrollo y en diferentes tejidos. Los transcritos de *Cat2* y *Cat3* son inducidos solo con muy altas concentraciones de ABA (100 y 1000 µM) durante la embriogénesis tardía y en respuesta a varias concentraciones de ABA en embriones germinados. Los transcritos de *Cat1* se acumulan en etapas tardías del desarrollo y en embriones germinados. La expresión de *Cat1* es inducida en tres etapas del desarrollo: embriogénesis, germinación del embrión y en hojas jóvenes. Sin embargo, estos mismos autores encontraron que los transcritos de *Cat3* son inhibidos por ABA en hojas jóvenes siendo éste el único reporte donde específicamente el ABA inhibe la expresión génica de un tipo de catalasa similarmente a lo observado en el presente estudio, aunque en concentración muy alta (1000 µM) y bajo otras condiciones de tratamiento, distintas a las utilizadas en las microplantas de papa utilizadas en esta investigación y en una etapa específica del desarrollo de las plántulas de maíz. La expresión de *Cat* en respuesta a ABA es debida en parte, a que el ABA media cambios metabólicos, cambios que llevan a cambios en las ERO, las cuales en su momento llevan a la inducción de la defensa antioxidante. Guan y Scandalios (1998a), postulan que el H₂O₂ también induce respuestas similares al ABA en la expresión de *Cat* en plántulas de maíz. Es posible que en las condiciones experimentales de esta investigación, la actividad catalasa mas que participar como sistema antioxidante en la desintoxicación de H₂O₂, participó como modulador de las respuestas de estrés para ayudar a inducir

tolerancia y resistencia a través de permitir que los niveles de H_2O_2 fueron los requeridos para participar en la transducción de señales que llevaron a la expresión de genes necesarios para dar respuesta a las diferentes condiciones de estrés.

Otro resultado importante encontrado en este trabajo, fue que los niveles de la actividad de la catalasa en las microplantas de papa tratadas con ABA no cambiaron en las tres etapas evaluadas (Fig. 9), mientras, que en las microplantas no tratadas, si disminuyó. El tratamiento con ABA parece haber inducido a las plantas a ser más tolerantes al estrés por trasplante al suelo (etapa b) y baja temperatura (etapa c), lo que sugiere que el ABA participa en la resistencia cruzada o aclimatación. Esto concuerda con lo encontrado por Pospisilova *et al.* (1999), que reportaron que el ABA ayuda a disminuir el impacto del trasplante y a la aclimatación de plántulas de tabaco, de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, muy similar a lo que encontramos en las microplantas de papa de ambas variedades en este trabajo. Igualmente, Aguilar *et al.* (2000), encontraron que el ABA ayuda a la supervivencia de microplantas de *Tagetes erecta* al ser subcultivadas directamente al campo, y que inclusive son más vigorosas. Esta respuesta, fue muy similar a lo encontrado en las microplantas de papa, ya que ambas variedades tratadas con ABA crecieron más vigorosas en condiciones de invernadero con respecto a las no tratadas (Anexo 4).

Con los resultados aquí presentados es posible sugerir, que las respuestas del ABA dependen tanto de la dosis como del tiempo y la forma de aplicación y aun más de la especie, de la variedad y de la etapa del desarrollo.

5.2.2. Efecto del ABA en las actividades enzimáticas de la APX y POX, y contenido de H_2O_2 .

La actividad de las enzimas APX y POX se incrementó significativamente en las microplantas de papa tratadas con ABA 10 μ M (Figs. 11 y 12), estas enzimas se ha encontrado que incrementan su actividad durante la aclimatación a frío en plántulas de maíz (Prasad *et al.*, 1994b; Anderson *et al.*, 1995; Iannelli *et al.*, 1999), en radículas de plántulas de pepino (Kang y Salveit, 2002) y en plantas de algodón (Payton *et al.*, 2001). El ABA también, induce la actividad enzimática de la APX como se reportó en hojas (Jiang y Zhang, 2001, Hu *et al.*, 2005) y plántulas de maíz (Gong *et al.*, 1998;

Jiang y Zhang, 2002abc, 2003), en hojas de espinaca (Yoshimura *et al.*, 2000), en plántulas de *Stylosanthes guianensis* (Zhou *et al.*, 2005ab), y en algas (Yoshida *et al.*, 2003). Son pocos los estudios donde se demuestra que el ABA induce la actividad de la POX como se reporta en plántulas de maíz (Prasad *et al.*, 1994b; Gong *et al.*, 1998) y en plántulas de *Stylosanthes guianensis* (Zhou *et al.*, 2005a).

En general las peroxidasas son enzimas que incrementan su actividad ante el estrés oxidativo (Arora *et al.*, 2002; Kingston-Smith, 1999; Sato *et al.*, 2001; Scandalios, 2005), principalmente para contrarrestar el daño originado por ERO (Badawi *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2000; Jebara *et al.*, 2005). Por otro lado, está bien documentado que el ABA también está asociado a la inducción e incremento en contenido de ERO, especialmente de H₂O₂ (Prasad *et al.*, 1994b; Guan y Scandalios, 1998ab; Pei *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001ab; Jiang y Zhang, 2000,2002cb; Neill *et al.*, 2002ab; Desikan *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005a; Bright *et al.*, 2006). Basados en estas evidencias, el tratamiento de ABA indujo incremento significativo en la actividad de APX y POX en microplantas de papa, posiblemente contrarrestando los niveles de H₂O₂ y esto pudo evitar que la concentración de H₂O₂ inducida por el propio tratamiento de ABA se incrementara a niveles tóxicos o letales, aun así, la concentración de H₂O₂ fue significativamente mayor en las plantas tratadas con ABA con respecto a las plantas no tratadas. Los resultados aquí presentados sugieren que las actividades enzimáticas antioxidantes de la CAT, APX y POX estuvieron coordinadas conjuntamente para modular las respuestas al estrés oxidativo de modo que la inducción e inhibición enzimática condujo a respuestas de tolerancia y/o aclimatación. Así, se propone la hipótesis de que la disminución en la actividad de la catalasa, que se ha propuesto que es una enzima con la capacidad de autorregularse ante el estrés para inducir respuestas de defensa y tolerancia (Volk y Feierabend, 1989, citado por Willekens *et al.*, 1995) contribuyó a incrementar el contenido de H₂O₂, y las APX y POX evitaron que éste incrementara a niveles letales, de esta manera, la actividad conjunta de CAT, APX y POX permitió que los niveles de H₂O₂ fueran significativamente mayores en las microplantas de papa tratadas con ABA que en los testigos en ambas variedades (Fig. 13), estos resultados confirman que el ABA aumenta los niveles de H₂O₂ y que éste

además es un intermediario de las respuestas inducidas por ABA (Guan *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2002ab; Bhattacharjee, 2005).

Por otro lado, también es posible que el H₂O₂ inducido por ABA en las microplantas de papa, fuera principalmente eliminado por la APX, ya que esta se encuentra distribuida en casi todos los compartimentos celulares que producen ERO (Shigeoka *et al.*, 2002) y no la POX, porque se sabe tiene poca afinidad de sustrato específico, y además sus principales funciones son las reacciones peroxidativas en la célula más que la remoción de H₂O₂ (van Huystee, 1987, citado por Willekens *et al.*, 1995), aunque debido a su gran incremento inducido por ABA en las microplantas de papa, no se descarta que tuvo una participación muy significativa en la desintoxicación del H₂O₂.

Los niveles de H₂O₂ aumentan ante un estrés, este incremento tiene una doble función durante las respuestas al estrés (Dat *et al.*, 2000; Apel y Hirt, 2004; Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005; Navrot *et al.*, 2007); incrementando el daño oxidativo que lleva a la destrucción de los componentes celulares o como señal para activar las respuestas de defensa (Dat *et al.*, 2000; Guan y Scandalios, 2000).

El tratamiento de ABA incrementó significativamente el contenido de H₂O₂ en las microplantas de papa de 28 días de cultivo en ambas variedades (etapa a), y se mantuvo aún cuando las microplantas se trasplantaron al suelo (etapa b) y después de la exposición al frío (etapa c, Fig. 13), lo que no ocurrió con las microplantas no tratadas, que incrementaron significativamente el contenido de H₂O₂ solo después de la exposición al frío con respecto al etapa 'a' (Fig. 13).

Estos resultados sugieren, que el tratamiento de ABA protegió a las microplantas de las exposiciones a estrés tanto al trasplante al suelo como a la exposición al frío, no así a las microplantas no tratadas donde si hubo incremento de H₂O₂, estas mismas respuestas fueron observadas en la actividad de la CAT (Fig. 9). El incremento de H₂O₂ inducido por ABA en las microplantas posiblemente participó como molécula señal de las respuestas de ABA que desencadenaron una serie de eventos que indujeron tolerancia a baja temperatura pero, que gracias al coordinado balance entre los antioxidantes no fue letal. Se corrobora en esta investigación que las respuestas de ABA pueden ser mediadas por H₂O₂ como ha sido ampliamente documentado (Pei *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001ab; Neill *et al.*, 2002ab; Bright *et al.*, 2006).

Por otro lado, el H₂O₂ modula la expresión de varios genes, incluyendo los que codifican enzimas antioxidantes para la inducción de tolerancia (Prasad *et al.*, 1994a; Polidoros y Scandalios, 1999; Neill *et al.*, 2002a; Vandenabeele *et al.*, 2003) así como otros genes relacionados a las respuestas de defensa de las plantas, Desikan *et al.* (2001), encontraron que el H₂O₂ regula 175 genes de los cuales 62 son reprimidos en *Arabidopsis*.

Con estas evidencias es posible que en el modelo empleado en este trabajo, la inducción de H₂O₂, promoviera respuestas que llevaron a las microplantas de papa de ambas variedades a la tolerancia a baja temperatura.

5.2.3. Efecto del ABA en el contenido de AA y la actividad de la AO.

Efecto del ABA en la contenido de AA

En esta investigación también se cuantificó un antioxidante no enzimático, el ácido ascórbico, que es muy importante en el sistema de protección de las plantas contra estrés biótico y abiótico, y es quizá el antioxidante no enzimático más importante en la eliminación de H₂O₂ (Foyer y Lelandais, 1993; Arora *et al.*, 2002). Además, el AA participa en muchos procesos metabólicos de las plantas tales como; la división celular y crecimiento (Franceschi y Tarlyn, 2002); balance en los procesos redox durante la fotosíntesis y desintoxicación del estrés oxidativo inducido por el ambiente (Noctor y Foyer, 1998; Smirnoff, 2000; Franceschi y Tarlyn, 2002). También, se ha encontrado que el AA es una señal molecular de transducción en las plantas para inducir tolerancia a estrés (Pastori *et al.*, 2003; Pignocchi y Foyer, 2003; Foyer y Noctor 2005).

Existen evidencias de que el AA participa en el crecimiento de las plantas (Franceschi y Tarlyn, 2002). En mutantes de *Arabidopsis* con bajo contenido de AA, hay inhibición del crecimiento con respecto al tipo silvestre (Pastori *et al.*, 2003). Como ya mencionamos el tratamiento de ABA inhibió significativamente el crecimiento de microplantas de papa de ambas variedades con respecto a las no tratadas (Fig. 2), sin embargo, el contenido de AA fue significativamente mayor en las microplantas tratadas con respecto a los testigos (Fig. 15), por lo que, a pesar de un significativo incremento en el contenido de AA hubo una fuerte inhibición del crecimiento, lo que sugiere que el AA en este caso, posiblemente, no participó en el crecimiento de la planta. Aunque está

demostrado que el ABA y el AA participan en el crecimiento como se demostró en mutantes de *Arabidopsis* con bajo contenido de AA donde se encontró que hay un incremento de ABA con respecto al tipo silvestre, y que esto posiblemente junto con la inducción de etileno promueven la inhibición del crecimiento (Pastori *et al.*, 2003). En esta investigación la concentración de ABA aplicada en forma exógena pudo haber cambiado las concentraciones de etileno y de esta forma sinérgica inducir la inhibición del crecimiento de las microplantas de papa, además, el ABA induce la ICK1, que es una proteína inhibidora de cinasas, la cual lleva a la inhibición de la división celular y crecimiento de la planta (Wang *et al.*, 2000, citado por Pastori *et al.*, 2003) por lo que es posible, que el ABA no solo actúa con otras hormonas de las plantas para inducir inhibición en el crecimiento sino además, a través de muchas otras rutas de señalización que aun no se han esclarecido.

Por otro lado, la enzima APX utiliza AA como sustrato específico y donador de electrones para reducir al H_2O_2 a H_2O con la generación de MDHA (Mehlhorn *et al.*, 1996; Shigeoka *et al.*, 2002) por lo que, el incremento del AA en las microplantas de papa tratadas con ABA (Fig. 15) se relaciona al incremento de la actividad enzimática de la APX (Fig.11), entonces, el incremento de ERO especialmente el H_2O_2 inducido por ABA, llevó a una inducción significativa de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para evitar el daño oxidativo. Además, el incremento simultáneo entre AA y APX, pudo ser requisito indispensable para evitar el daño oxidativo y posiblemente inducir tolerancia a baja temperatura en estas microplantas de papa. Recientemente se demostró que cambios en la disponibilidad del AA vía la relación ABA y ABA/GA₃, modulan las señales en las respuestas del crecimiento y defensa en las plantas (Pastori *et al.*, 2003). Por lo que, es posible que el incremento de AA en las microplantas tratadas con ABA pudo estar involucrado en la señalización para la defensa general de la planta resultando en una tolerancia al frío. Además, el AA actúa directamente sobre radicales muy tóxicos como el superóxido y el oxígeno en estado singulete que se forman por estrés de cualquier tipo (Shalata y Neumann, 2001), por lo que este antioxidante no enzimático contribuyó a evitar un daño de estrés en las microplantas de papa tratadas con ABA.

Por otro lado, se encontró mayor contenido de AA en la variedad Atlantic que es más sensible a las bajas temperaturas que en la variedad Alpha (Fig. 15) de manera contraria, la variedad Alpha generalmente mostró tendencia a tener mayor actividad enzimática en todas las enzimas analizadas y mayor contenido de H_2O_2 , por lo que, posiblemente el contenido de AA *per se* pueda estar relacionado a las respuestas que la variedad Atlantic mostró a los tratamientos de ABA (Fig. 1) y a una respuesta de mayor tolerancia a la exposición al frío que la variedad Alpha, ya que 4 tratamientos de ABA incrementaron la tolerancia a baja temperatura en microplantas de la variedad Atlantic, mientras en la variedad Alpha solo a 2 y además, la variedad Atlantic incrementó significativamente la supervivencia con respecto a la variedad Alpha (Fig. 1). A la fecha no existen, reportes que asocien un mayor contenido de AA con tolerancia a temperaturas de congelamiento. Sin embargo, en este trabajo se demuestra que posiblemente un mayor contenido de AA está asociado a una mayor tolerancia al estrés por baja temperatura en las microplantas de papa. Hay evidencias de que el estrés lleva a un incremento rápido en la concentración y/o en un balance redox del AA del apoplasto, lo que induce tolerancia a estrés, como por ejemplo; en las plantas de *Phaseolus vulgaris* tolerantes a estrés por ozono tuvieron 2 veces más contenido de AA que las susceptibles, sugiriendo que la tolerancia al ozono está asociada con el AA extracelular del apoplasto y el balance redox (Burkey *et al.*, 2003). En *S. tuberosum* el incremento de AA y otros antioxidantes enzimáticos estuvieron relacionados a tolerancia a la salinidad (Benavides *et al.*, 2000); y la aplicación exógena de AA también ha mostrado que induce tolerancia a salinidad, como se demostró en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y además reduce la peroxidación de lípidos (Shalata y Neumann, 2001).

Otro aspecto interesante del incremento en el contenido de AA inducido por ABA en las microplantas de papa, es que éste se encontró en mayor porcentaje en su forma oxidada (DHA, Tabla 1), en las microplantas incubadas en ABA con respecto a las plantas no tratadas. Lo que indica que el AA está siendo utilizado para degradar el H_2O_2 presente en la célula (Pignocchi y Foyer, 2003; de Pinto y De Gara, 2004). El AA es oxidado enzimáticamente o no enzimáticamente a DHA, pero en el simplasto la regeneración enzimática de AA de DHA ocurre vía ciclo glutatión-ascorbato, haciendo

que el AA sea el principal amortiguador redox en las plantas. La ascorbato oxidasa (AO) enzima de la pared celular regula el sistema redox de AA en el apoplasto, oxida al AA con la correspondiente reducción de O_2 a H_2O (Pignocchi y Foyer, 2003). No hay claras evidencias de regeneración de AA en el apoplasto, sin embargo, existen un sistema de acarreadores vía membrana asociados al intercambio del AA del citoplasma por DHA del apoplasto con lo que se mantiene el balance redox (Horemans *et al.*, 2000). La relación AA/DHA es sumamente importante para los balances en el sistema redox en la reducción del H_2O_2 y la función de las enzimas enzimáticas encargadas de la remoción de las ERO (Kärkönen y Fry, 2006). El incremento de AA inducido por ABA en las microplantas de papa además de participar en la eliminación de ERO, también es posible que participa en el mantenimiento del balance redox para el funcionamiento de las proteínas involucradas en la tolerancia a estrés al frío, y no se descarta que además participe en la inducción de la tolerancia tanto por su acción antioxidante como por su función como señal.

Efecto del ABA en la actividad enzimática de la AO

El AA que se encuentra en el apoplasto es oxidado por la ascorbato oxidasa (AO), el proceso de esta reacción, se cree participa en la elongación de los tejidos y en el crecimiento celular (Kato y Esaka, 1999), por su localización extracelular y su alta actividad en tejidos en expansión, aunque su función específica no está del todo clara (Pignocchi *et al.*, 2003). En recientes estudios en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan AO, se encontró que elongan y engrosan sus tallos mas rápidamente que la forma silvestre (Kato y Esaka, 2000; Pignocchi *et al.*, 2003, 2006). Se cree que algunos mecanismos por los cuales el AO participa el crecimiento celular es debido a que el MDHA generado por AA y AO en el apoplasto estimula el crecimiento celular a través del incremento del tamaño de la vacuola (Hidalgo *et al.*, 1989) y la absorción de iones causada por la despolarización de la membrana plasmática, además, el DHA se considera ser el responsable del alargamiento celular por permitir el reacomodo de la pared celular (Lin y Varner, 1991, citado por Pignocchi *et al.*, 2003).

Considerando estos hallazgos y tomando en cuenta que la AO es una enzima involucrada en el estrés oxidativo objeto principal de esta investigación, se estudió la actividad de dicha enzima para encontrar su posible relación con la drástica inhibición

del crecimiento inducida por ABA en las microplantas de papa encontrada en este trabajo, y que no existen reportes de la relación ABA/AO en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, la actividad de la AO se incrementó significativamente en las microplantas tratadas con ABA con respecto a las microplantas no tratadas en ambas variedades (Fig. 14), lo que se contrapone a lo encontrado en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan AO y tienen mayor crecimiento con respecto al tipo silvestre (Pignocchi *et al.*, 2003, 2006). Por lo encontrado en este trabajo, es probable que el incremento de AO y AA inducido por ABA en microplantas de papa, no tuviera relación con la inhibición del crecimiento. El incremento de la actividad AO y contenido de AA inducido por ABA en las microplantas de papa, si bien no tuvo influencia en el crecimiento, y considerando que el apoplasto y la pared celular actúan como un reservorio de información del estrés tanto biótico como abiótico así como el principal conductor de información entre las células (Pignocchi *et al.*, 2006), es probable entonces, que no solo participaron en la tolerancia a estrés al frío, sino además, es muy factible que estas microplantas hayan adquirido tolerancia a diferentes tipos de estrés (tolerancia cruzada), ya que, se ha demostrado que el AA y AO mantienen en homeostasis el sistema redox en el apoplasto donde se inicia la regulación de genes involucrados en la defensa a través de la señalización vía fitohormonas (Pastori *et al.*, 2003; Pignocchi *et al.*, 2003, 2006). El balance redox que mantienen AA y la AO es tan importante que inclusive la expresión genética de enzimas antioxidantes se ve afectada, tal es el caso en los transcritos de *CAT* durante el día y la noche en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan AO. Y aun más, se encontró gran abundancia de transcritos asociados con la fotorrespiración sugiriendo que la capacidad intracelular para generar H_2O_2 , también puede ser afectada por el estado redox del apoplasto (Pignocchi *et al.*, 2006).

Por otro lado se encontró que ABA induce H_2O_2 apoplástico en hojas de maíz (Hu *et al.*, 2005), entonces, es posible que en las microplantas de papa tratadas con ABA el AA presente en el apoplasto desintoxicara a las células de H_2O_2 , lo que incrementó la forma oxidada del AA inducido por ABA (Fig. 15). Todos los resultados aquí presentados sugieren que finalmente las respuestas desencadenadas por ABA son muy complejas y todas están ligadas en una red de señales, donde el objetivo principal es

proteger a la planta del estrés de cualquier tipo. En esta investigación se demostró que el incremento en la tolerancia a baja temperatura inducido por ABA está asociado a las respuestas de estrés oxidativo y del sistema antioxidante en microplantas de papa.

5.3. Efecto del H₂O₂ en la inducción de tolerancia al frío.

La hipótesis principal de esta investigación fue que si, el ABA induce tolerancia a estrés y el H₂O₂ es intermediario en dichas respuestas, entonces tratamientos exógenos de H₂O₂, inducirían respuestas similares a las inducidas por el tratamiento de ABA en tolerancia al frío, estrés oxidativo y antioxidantes.

Primero, se busco un modelo de supervivencia en esquejes para evaluar los tratamientos de H₂O₂, pero este mostró inconsistencias en las respuestas por las variables a considerar, por lo que no se pudo hacer replicable y no se llevó a cabo para esta investigación (Fig. 4). Sin embargo, estas respuestas permitieron conocer más algunos problemas en las técnicas de propagación de microesqueje al suelo. Los principales problemas a considerar en el trasplante son: el nivel del esqueje en la microplanta, la sensibilidad de la variedad al trasplante a suelo y la época del año entre otros. Las respuestas a los tratamientos de H₂O₂ para estudios de baja temperatura fueron más estables en plantas completas.

Entonces, para estudiar los efectos del H₂O₂ en microplantas de papa, los tratamientos se realizaron de dos maneras: incubación de esquejes y plantas completas. La incubación de esquejes en H₂O₂ se realizó de la forma propuesta por López-Delgado *et al.* (1998a), en la cual los microesquejes de microplantas de papa se incuban por 1 hora en H₂O₂ y después se cultivaron en condiciones *in vitro* por 28 días, de esta forma, solo la concentración 5 mM incrementó significativamente la tolerancia al frío en la variedad Atlantic (Fig. 5). Estos resultados llevaron a probar otra técnica de incubación la cual se realizó en microplantas completas de 28 días de cultivo, de esta manera el tratamiento de 15 mM de H₂O₂ incrementó la supervivencia a la exposición al frío en ambas variedades (Fig. 6). Aunque, este incremento fue significativo, fue inferior al inducido por el tratamiento de ABA y significativamente muy inferior en la variedad Atlantic (Fig. 1), donde, el tratamiento de ABA aumentó 12% mas la sobrevivencia en la variedad Alpha y 151% en la variedad Atlantic con respecto al tratamiento de H₂O₂.

Además, debemos considerar que en la técnica de incubación en H₂O₂, existe un estrés adicional generado por inundación (hipoxia-anoxia), por lo que se probó el efecto de dicho estrés sobre las respuestas de tolerancia al frío y se encontró que este estrés *per se* incrementa la tolerancia al frío con respecto a los testigos (microplantas sin inundación), la variedad Alpha aumentó la supervivencia 19.2% mientras que la variedad Atlantic 17.3% (Fig. 8). Por lo que, estos resultados demuestran que el tratamiento de H₂O₂ en la inducción de tolerancia al frío no fue tan efectivo como el tratamiento de ABA. Si bien, la inundación *per se* indujo tolerancia al frío, al parecer en combinación con diferentes concentraciones de H₂O₂ esta respuesta puede variar, porque, en las concentraciones 1 y 50 mM de H₂O₂, no hubo inducción de tolerancia, era de esperarse que independiente de la concentración de H₂O₂, hubiera inducción de tolerancia al frío solo por el efecto de hipoxia-anoxia y que inclusive pudiera ser sinérgica la respuesta (Fig. 6) para incrementar la tolerancia. Es posible entonces, que dependiendo de la concentración de H₂O₂, las respuestas del estrés por anoxia cambiaran. Está bien demostrado que la hipoxia-anoxia produce H₂O₂ y esto a su vez induce tolerancia (Blokline *et al.*, 2001; 2003).

Los resultados aquí presentados muestran que las respuestas por tratamientos de H₂O₂, pueden ser extremadamente sutiles y delicadas, y dependen de variables muy precisas como la concentración, tiempo de tratamiento, especie, variedad, etc. Esto confirma lo encontrado en *S. tuberosum*, donde tratamientos de H₂O₂ incrementan la tolerancia al frío solo en la variedad más sensible, pero al variar la concentración y el tiempo de exposición a baja temperatura se incrementó la tolerancia en las variedades sensibles y tolerantes (Mora y López, 2006). Los resultados aquí presentados confirman que el H₂O₂ induce tolerancia al frío como también se ha reportado en *S. tuberosum* (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora y López, 2006), en plántulas de maíz e inclusive puede inducir tolerancia cruzada (Prasad *et al.*, 1994ab; Gong *et al.*, 2001).

Por otro lado, se cuantificaron las actividades enzimáticas de la CAT, APX y POX, en microplantas de 28 días de edad preincubadas 1 hora en 15 mM de H₂O₂ (etapa a), 24 horas después de haber sido trasplantadas al suelo (etapa b) y después de 4 horas de exposición al frío (etapa c). La actividad de la CAT no mostró cambios significativos en relación con los testigos de ambas variedades en las tres etapas evaluadas. Sin

embargo, la actividad de la catalasa mostró una tendencia a disminuir después de la incubación en H_2O_2 (etapa a), es decir tendió a disminuir al trasplante al suelo (etapa b) y después de la exposición al frío (etapa c), siendo esta disminución significativa solo para las microplantas de la variedad Atlantic preincubadas en H_2O_2 con respecto a la etapa 'a' (Tabla 2). Estos resultados confirman que la catalasa es una enzima muy sensible al estrés (MacRae y Ferguson, 1985; Volks y Feierabend 1989, citado por Willekens *et al.*, 1995); y además, que la variedad Atlantic, que es la más sensible a baja temperatura, también muestra ser más sensible a las respuestas de estrés oxidativo y sistema antioxidante. Aunque la inhibición de la actividad de la CAT fue significativa en las microplantas tratadas con ABA y en el tratamiento de H_2O_2 no hubo diferencia entre tratamiento y testigos, debemos considerar que los tratamientos de ABA y H_2O_2 son diferentes, ya que las microplantas permanecen incubadas durante 28 días en el tratamiento de ABA y en el de H_2O_2 solo una hora. Los efectos del tratamiento de ABA durante 28 días inclusive son evidentes a simple vista como se muestra en la drástica inhibición del crecimiento (Figs. 2 y 3), es posible, entonces que la preincubación de las microplantas en H_2O_2 por 1 hora en este caso es insuficiente o inadecuada para que se den respuestas que se puedan asociar a las respuestas del H_2O_2 inducidas por ABA. Se requiere buscar un modelo de incubación en H_2O_2 que permita asociar con mayor precisión las respuestas debidas a la aplicación de H_2O_2 con las respuestas del H_2O_2 inducido por ABA en microplantas de papa.

Con respecto a la actividad de la APX y POX tampoco hubo diferencias significativas entre las microplantas preincubadas en H_2O_2 y los testigos en ambas variedades, en las tres etapas evaluadas (Tabla 3 y 4). Lo que confirma que la técnica de incubación en H_2O_2 aquí utilizada no fue la apropiada para encontrar las respuestas inducidas por H_2O_2 en corto plazo. Esto se apoya porque muchas de las respuestas encontradas por aplicación de H_2O_2 a corto plazo se han realizado en células en suspensión, por ejemplo, Desikan *et al.* (2001), encontraron que el tratamiento de H_2O_2 induce 113 y reprime 62 cDNAs en *Arabidopsis* (secuencias que se relacionan con el sistema de defensa de las plantas) en las primeras 1.5 a 3 horas; así mismo, la glutatión S transferasa (GST) y fenil amonio liasa (PAL) se incrementa en los primeros 30 minutos del tratamiento con diferentes concentraciones de H_2O_2 , incrementándose

continuamente hasta 5 horas (Desikan *et al.*, 1998); en soya se indujo la *GST* en los primeros 30 minutos incrementándose significativamente en 1 hora con 2 mM de H_2O_2 (Levine *et al.*, 1994), y en tomate se encontró entrecruzamiento de proteínas en la pared celular en los primeros 10 minutos del tratamiento de H_2O_2 1 mM (Brandy y Fry, 1997).

En plantas completas también son muy variadas las respuestas de los tratamientos de H_2O_2 , por ejemplo se indujeron transcritos *Cat1* y se inhibieron *Cat 2* y *Cat3* en plántulas de maíz donde las raíces se trataron con 30 y 50 mM de H_2O_2 por 24 horas (Guan *et al.*, 2000); en plántulas de maíz la aspersion cada 4 horas por tres veces de 0, 0.1, 0.3 y 0.5 mmol/L de H_2O_2 indujo adaptación cruzada, a calor, frío, sequía y salinidad (Gong *et al.*, 2001), y de 0.1 mM de H_2O_2 , por 24 horas indujo tolerancia al frío (Prasad *et al.*, 1994b). En hojas de *Arabidopsis* se indujo H_2O_2 con el tratamiento de 100 mM de H_2O_2 por 8 horas (Rao *et al.*, 1997), y en hojas de frijol de la variedad mungo el tratamiento de 10 mM de H_2O_2 a los 10 segundos incrementó el contenido de óxido nítrico (Lum *et al.*, 2002). Se ha propuesto además que el efecto inductor de termotolerancia del tratamiento de H_2O_2 por 1 hora puede ser a largo plazo en microplantas de papa (López-Delgado *et al.*, 1998a).

Todas estas evidencias demuestran que las respuestas del tratamiento con H_2O_2 son muy variadas, y van a depender del cultivo, si son plantas completas, semillas o células en suspensión, etapa del desarrollo, la forma de aplicación, el tiempo de exposición y otros factores.

Basados en estas evidencias se debe considerar modificar el modelo empleado en este estudio para acercarse más al conocimiento de las respuestas mediadas por ABA y H_2O_2 , ya que pueden ser útiles para inducir respuestas de tolerancia a diferentes condiciones de estrés en todos los cultivos.

5.4. Efecto del subcultivo sin ABA o trasplante en invernadero de microplantas pretratadas con ABA.

El tratamiento de 10 μ M de ABA en microplantas de papa, incrementó la tolerancia al frío (Fig. 1), sin embargo, inhibió drásticamente el crecimiento (Figs. 2 y 3). La inhibición

del crecimiento es uno de los principales efectos del ABA (Sharp y LeNoble, 2002; Finkelstein *et al.*, 2002).

Debido a la drástica inhibición y cambios en el estado oxidativo y antioxidativo inducida por ABA en las microplantas de papa, se investigó si estos cambios tenían efectos a largo plazo en la producción de semilla de papa, considerando que el modelo utilizado en esta investigación se basó en el sistema de producción semilla *in vitro*-invernadero-campo utilizado comúnmente en los programas de producción de semilla, para lo cual las microplantas cultivadas en ABA 0 y 10 μM (Fase 1) se trasplantaron a condiciones *in vitro* e invernadero para su recuperación (Mora-Herrera y López-Delgado, en prensa).

Efecto del subcultivo sin ABA

Las microplantas de las variedades Alpha y Atlantic subcultivadas en medio MS sin ABA por 28 días (Fase 2 *in vitro*) no mostraron diferencias significativas en el crecimiento y peso respecto a los testigos. Estos resultados muestran que las plantas previamente incubadas en ABA (Fase 1) no alcanzaron el tamaño ni el peso de las plantas testigo a pesar de que en la fase 2 el medio de cultivo MS no contenía ABA. Sin embargo, las microplantas previamente incubadas en ABA (Fase 1) tuvieron una tasa de crecimiento (Fig. 16) y peso (Fig. 17) significativamente mayor que las plantas testigo. Es posible que la tasa de crecimiento tan alta de las microplantas preincubadas en ABA (Fase 1) esté relacionada al alto contenido de AO que tenían las microplantas de papa, y que al estar en ausencia de ABA permitiera una elongación de los tallos muy rápida como lo encontrado en las plantas de tabaco con alto contenido de AO y que crecen más que el tipo silvestre (Pignocchi *et al.*, 2003, 2006).

Respuestas similares fueron observadas en las actividades enzimáticas de la catalasa, APX y POX así como en el contenido de H_2O_2 . Estos parámetros se evaluaron en la fase 2 para conocer si las microplantas se recuperaban en los cambios inducidos por el tratamiento de ABA (Fase 1).

El tratamiento de ABA disminuyó la actividad de la CAT en las microplantas de papa (Fase 1, Figs. 9 y 18), pero, una vez que las microplantas fueron trasplantadas a medio libre de ABA por 28 días más (Fase 2) la actividad de la CAT fue similar a la de las microplantas testigo (Fig. 18).

La actividad enzimática de la APX y la POX así como el contenido de H₂O₂, incrementaron en las plantas tratadas con ABA con respecto a las no tratadas (Fase 1), y en la Fase 2 disminuyeron a los niveles de los testigos (Figs. 19, 20 y 21). Los resultados aquí presentados, indican que las microplantas tienen la capacidad de recuperarse del estrés inducido por ABA y que a pesar de los cambios drásticos en la inhibición del crecimiento y cambios en la actividad antioxidante así como un incremento de H₂O₂, las plantas después de 28 días logran recuperarse y regresar a las condiciones de las plantas no tratadas (Mora-Herrera y López-Delgado, en prensa). Similar recuperación de estrés inducido por salicilatos, fue reportado previamente en *S. cardiophyllum*, donde la organogénesis *in vitro* de tallos fue producida en respuesta al subcultivo a medio libre de salicilatos, la organogénesis estuvo asociada con un significativo incremento de la actividad fosfatasa (Lopez-Delgado y Carrillo-Castañeda, 1996). Aunque, no existen reportes de evidencias que indiquen qué sucede en tratamientos severos de estrés inducidos por ABA a largo plazo.

Efecto del trasplante en condiciones de invernadero de microplantas pretratadas con ABA

En condiciones en invernadero todos los parámetros evaluados como longitud, peso seco, número de tubérculos, peso de tubérculos y porcentaje de brotación fueron similares al final de la cosecha en las plantas pretratadas y no tratadas con ABA (Fase 1, Tabla 5).

Las plantas estuvieron en condiciones de invernadero por 120 días y cabe destacar que a los 30 días del trasplante (de *in vitro* a invernadero) las plantas pretratadas y no tratadas tenían el mismo tamaño (Anexo 4), lo que sugiere que la recuperación del efecto del ABA en estas condiciones es a corto plazo y además, corrobora los resultados obtenidos de crecimiento en la recuperación *in vitro*, en donde las plantas pretratadas con ABA tuvieron una tasa de crecimiento significativamente mayor que las microplantas no tratadas (Fig. 16), aunque esta tasa de crecimiento tuvo un límite ya que al final de 120 días las plantas pretratadas y no tratadas tenían el mismo tamaño.

El tratamiento de ABA es potencialmente útil para inducir tolerancia a baja temperatura en microplantas de papa con diferente sensibilidad al frío, sin efectos dañinos a largo plazo sobre la producción de papa, ni efectos en la propagación *in vitro*.

VI. CONCLUSIONES

1. El tratamiento de ABA en las microplantas de papa es potencialmente útil para inducir tolerancia a baja temperatura, tanto en variedades sensibles como en tolerantes.
2. La inducción de tolerancia inducida por ABA en microplantas de papa está directamente relacionada con las respuestas de estrés oxidativo y con el sistema antioxidante.
3. El ABA incrementa el contenido de H_2O_2 , el cual se cree está implicado en las respuestas inducidas por ABA en la tolerancia al frío.
4. El ABA incrementa la actividad antioxidante enzimática y no enzimática.
5. El ABA inhibe la actividad de dos isoenzimas de catalasa e induce otra en las microplantas de papa.
6. El ABA no tiene efectos a largo plazo en el metabolismo del sistema antioxidante en microplantas de papa.
7. El ABA no tiene efectos a largo plazo en el rendimiento del cultivo de la papa.
8. El tratamiento de H_2O_2 es potencialmente útil para incrementar la tolerancia al frío.
9. Los tratamientos de H_2O_2 utilizados en esta investigación no permiten encontrar la relación de las respuestas antioxidantes involucradas en la tolerancia a frío entre ABA y H_2O_2 .

6.1 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este estudio generan un campo de investigación básica con fines prácticos, que tienen el propósito de mejorar las prácticas culturales hasta ahora usadas en el país, las cuales son muy costosas y tienen alto impacto sobre el ambiente y la salud humana.

Esta investigación generó algunas evidencias importantes para empezar a conocer las respuestas fisiológicas de las plantas involucradas en la tolerancia a estrés abiótico, sin embargo, se requiere por conocer exactamente como funcionan dichas respuestas. Para contribuir al conocimiento científico para buscar que las plantas sean más tolerantes o adquieran tolerancia al estrés, se continuará con las siguientes líneas de investigación:

- Caracterizar las isoenzimas de catalasa encontradas en papa.
- Estudiar la expresión génica de CAT
- Aplicar la información generada en esta investigación para probar la inducción de tolerancia a otros factores de estrés en papa y otros cultivos (tolerancia cruzada o inducida).
 - Investigar el nivel de regulación inducido por ABA.
 - Adecuar un modelo de tratamiento con H_2O_2 para aplicarlo en la tolerancia a estrés.
 - Investigar la función de ácido ascórbico en la tolerancia a estrés.
 - Investigar la participación de la AO en las respuestas inducidas por ABA.
 - Investigar la respuesta de otros antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en las respuestas de estrés inducidas por ABA y otros compuestos relacionados con el estrés oxidativo.

VII. LITERATURA CITADA

- Aebi H. **1984**. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzimology*. 105:121-126.
- Aguilar ML, Espadas FL, Coello J, Maust BE, Trejo C, Robert ML and Santamaría JM. **2000**. The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *Journal of Experimental Botany*. 51(352):1861-1866.
- Alscher RG, Erturk N and Heath LS. **2002**. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53(372):1331-1341.
- Anderson MD, Prasad TK and Stewart CR. **1995**. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*. 109:1247-1257.
- Anderson MD, Prasad TK, Martin BA and Stewart CR. **1994**. Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. *Plant physiology*. 105:331-339.
- Apel K and Hirt H. **2004**. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55:373-99.
- Arora A, Sairam RK and Srivastava GC. **2002**. Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Current Science*. 82(10):1227-1238.
- Asada K. **1992**. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 85:235-241.
- Badawi GH, Kawano N, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kudo A and Tanaka K. **2004**. Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum*. 121:231-238.
- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier M, Gagnon J and Triantaphylidès. **1998**. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cell. *Plant Journal*. 13:519-527.

- Barabás KN, Szegletes Z, Pestenác A, Fülöp K and Erdei L. **1997**. Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defense mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 153:146-153.
- Barnes JD, Zheng Y and Lyons TM. **2002**. Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. In K Omasa, H Saji, S Youssefian, N Kondo, eds, *Air Pollution and Plant Biotechnology*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 235-254.
- Benavides MP, Marconi PL, Gallego SM, Comba ME and Tomaro ML. **2000**. Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27(3):273-278.
- Bhattacharjee S. **2005**. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*. 89(7):1113-1121.
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV. **2003**. Antioxidants, Oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 91:179-194.
- Blokhina OB, Chirkova TV and Fagerstedt KV. **2001**. Anoxic stress lead to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany*. 52(359):1179-1190.
- Bolwell GP and Wojtaszek P. **1997**. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 51:347-366.
- Bolwell GP. **1999**. Role of oxygen species and NO in plant defense responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 2:287-294.
- Bowler C, Montagu MV and Inze D. **1992**. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43:83-116.
- Bradford MM. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1-2):248-254.
- Brandy JD and Fry SC. **1997**. Formation of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal elicitors or H₂O₂. *Plant Physiology*. 115:87-92.

- Bravo LA, Zúñiga GE, Alberdi M and Corcuera LJ. **1998**. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. *Physiologia Plantarum*. 103:17-23.
- Bray EA, Bailey-Serres J and Weretilnyk. **2000**. Responses to abiotic stresses. In Buchanan B, Gruissem W and Jones R, ed. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA. American Society of plant physiologist Press. pp. 1158-1203.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS and Neill SJ. **2006**. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*. 45:113-122.
- Browse J and Xin Z. **2001**. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. 4:241-246
- Burdon RH, Gill V, Boyd PA and O’Kane D. **1994**. Chilling, oxidative stress and antioxidant enzyme responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. 102B:177-185.
- Burkey KO, Eason G and Fiscus EL. **2003**. Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content and redox status. *Physiologia Plantarum*. 117(1):51-57.
- Centro Internacional de la Papa, CIP. **1998**. La papa en cifras.
- Chen HH, Li PH and Brenner ML. **1983**. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiology*. 71:362-365.
- Chen IM, Lin CC and Kao CH. **2000**. Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica Taipei*. 41(2):99-103.
- Chen THH and LV Gusta. **1983**. Abscisic acid-induced freezing tolerance in cultured plants cell. *Plant Physiology*. 73:71-75.
- Cruz-Ortega R, Ayala-Cordero G and Anaya AL. **2002**. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiologia Plantarum*. 116:20-27.
- Dalal M and Khanna-Chopra R. **2001**. Differential response of antioxidant enzymes in leaves of necrotic wheat hybrids and their parents. *Physiologia Plantarum*. 111:297-304.

- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D and Van Breusegem F. **2000**. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57:779-795.
- de Pinto MC and De Gara L. **2004**. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*. 55(408):2559-2569.
- del Rio LA, Corpas FJ, Scandalio LM, Palma JM, Gómez M and Barroso JB. **2002**. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*. 53(372):1255-1272.
- del Rio LA, Palma JM, Scandalio LM, Corpas FJ, Pastori GM, Bueno P and López-Huertas E. **1996**. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions*. 24:434-438.
- Desikan R, Cheung M-K, Bright J, Henson D, Hancock JT and Neill SJ. **2004**. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany*. 55(395):205-212.
- Desikan R, Clarke A, Hancock JT and Neill SJ. **1999**. H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*. 50:1863-1866.
- Desikan R, Mackerness-H SA, Hancock JT and Neill SJ. **2001**. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*. 127:159-172.
- Desikan R, Neill SJ and Hancock JT. **2000**. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology and Medicine*. 28:773-778.
- Desikan R, Reynolds A, Hancock JT and Neill S.J. **1998**. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemical Journal*. 330:115-120.
- Ducreux G, Rossignol L y Rossignol M. **1986**. La patata. *Mundo Científico*. 57:408-423.

- Espinoza N, Estrada R, Tovar P, Bryan J and Dodds JH. **1984**. Tissue culture micropropagation, conservation, and export of potato germplasm, specialized technology. Document 1. International Potato Center. 20 p.
- Espinoza NO, Estrada R, Silva-Rodríguez D, Tovar P, Lizarraga R and Dodds JH. **1986**. The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture*. 15:21-26.
- Espinoza NO. **1988**. Los múltiples viajes y migraciones de la papa latinoamericana. *Revista Latinoamericana de papa*. 1:7-8.
- Fadzillah NM, Gill V, Finch RP and Burdon RH. **1996**. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta*. 199:552-556.
- Feierabend J, Schaan C and Hertwig B. **1992**. Photoinactivation of catalase occurs under both high-and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology*. 100:1554-1561.
- Finkelstein RR, Gampala SSL and Rock CD. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*. 14:S15-S45.
- FONAIAP Divulga. **1995**. Producción de semilla pre-básica de papa. FONAIAP.CIAE MÉRIDA No 48 abril-junio 1995 José Salas.
- Foyer CH and Halliwell B. **1976**. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133:21-25.
- Foyer CH and Lelandais M. **1993**. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In *Photosynthetic Responses to the Environment* (ed. H.Y. Yamamoto). *American Society of Plant Physiologists*. Rockville. pp 88-101.
- Foyer CH and Noctor G. **2000**. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *The New phytologist*. 146:359-388.
- Foyer CH and Noctor G. **2005**. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 28:1056-1071.
- Foyer CH, Descourvieres P and Kunert KJ. **1994a**. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*. 17:507-523.

- Foyer CH, Lelandais M and Kunert KJ. **1994b**. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 92:616-717.
- Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF and Scott IM. **1997**. Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*. 100:241-254.
- Foyer CH, Rowell J and Walter D. **1983**. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157:239-244.
- Franceschi VR and Tarlyn NM. **2002**. L-Ascorbic Acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology*. 130:649-656.
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Blowers DA and Baker NR. **1998**. Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology*. 116:571-580.
- Gallardo Carrillo PG. **2006**. Riesgos de competitividad de los productores mexicanos de papa fresca: caso Valle del Fuerte, Sinaloa frente al tratado de libre comercio de América del Norte. Tesis Doctorado. Centro de Investigaciones y Docencia en Humanidades del Estado de Morelos. CIDHEM. México. pp 184
- Gallegly ME and Galindo JA. **1958**. Mating types and spores of *Phytophthora infestans* in nature México. *Phytopathology*. 48:274-276.
- Gibbs J and Greenway H. **2003**. Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology*. 30(3): 353 -353.
- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhlert JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB and Labarre J. **1998**. The H₂O₂ stimulus in *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of Biological Chemistry*. 273(34):22480-22489.
- Golmirzaie A y Mendoza H. **1988**. Estrategias de mejoramiento para la producción de semilla sexual de papa. Centro Internacional de la Papa. CIRCULAR, Vol. 16, No 4.

- Golmirzaie A, Ortiz R y Serquén F. **1990**. Genética y mejoramiento de la papa mediante semilla (sexual). Centro Internacional de la Papa, CIP. 35 p.
- Gong M, Chen B, Li Z-G and Guo L-H. **2001**. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *Journal of Plant Physiology*. 158(9):1125-1130.
- Gong M, Y-J Li and S-Z Chen. **1998**. Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *Journal of Plant Physiology* 153:488-496.
- Grossmann K and Hansen H. **2001**. Ethylene-triggered abscisic acid: A principle in plant growth regulation?. *Physiologia Plantarum*. 113(1):9-14.
- Guan LM and JG Scandalios. **1998a**. Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. *Physiologia Plantarum*. 104:412-422.
- Guan LM and Scandalios JG. **1998b**. Two structurally maize cytosolic superoxide dismutase genes, Sod4 and Sod 4A, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiology*. 117:217-224.
- Guan LM and Scandalios JG. **2000**. Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free radical Biology and Medicine*. 28(8):1182-1190.
- Guan LM, J Zhao and Scandalios. **2000**. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal*. 22:87-95.
- Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F and del Rio IA. **1995**. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*. 105:151-167.
- Hernández JA, Talavera JM, Martínez-Gómez P, Dicenta F and Sevilla F. **2001**. Response of antioxidant enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiologia Plantarum*. 111: 313-321.
- Hidalgo A, Gonzalez-Reyes JA and Navas P. **1989**. Ascorbate free radical enhances vacuolization in onion root meristems. *Plant Cell Environment*. 12:455-460.

- Hodges D, Andrews C, Jonson J and Hamilton R. **1997**. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Science*. 37:857-863.
- Hooker WJ. **1980**. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa. Versión española de Teresa Ames de Icochea. CIP, Lima. 166 p.
- Horemans N, Foyer CH and Asard H. **2000**. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science*. 5:263-267.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J-P, Hanafey MK, Tingey SV and Chua N-H. **2002**. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science*. 115:4891-4900.
- Hu X, Jiang M, Zhang A and Lu J. **2005**. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*. 223(1):57-68.
- Iannelli M, van Breusegem K, van Montagu M, Inze D and Massacci A. **1999**. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated stress in two maize genotypes. *Journal of Experimental Botany*. 50:523-532.
- Ievinsh G, Kruzmane D, Rusite E, Arente G and Gertnere D. **2000**. Modulation of *Solanum tuberosum* L. morphogenesis and antioxidative status in a stem explant culture by limitation of gas exchange: putative effects of ethylene. *Journal of Plant Physiology*. 156:717-723.
- Janowiak F, Luck E and Dörffling K. **2003**. Chilling tolerance of maize seedlings in the field during cold periods in spring is related to chilling-induced increase in abscisic acid level. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 189:156-161.
- Janowiak F, Mass B and Dörffling K. **2002**. Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 159(6):635-643.
- Jebara A, Jebara M, Liman F and Aouani ME. **2005**. Changes en ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 162:929-936.

- Jiang M and Zhang J. **2001**. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidant defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*. 42(11):1265-1273.
- Jiang M and Zhang J. **2002a**. Role of abscisic acid in water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Research*. 36(9):1001-1015.
- Jiang M and Zhang J. **2002b**. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 53(379):2401-2410.
- Jiang M and Zhang J. **2002c**. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*. 215:1022-1030.
- Jiang M and Zhang J. **2003**. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant, Cell and Environment*. 26:929-939.
- Jiménez A, Hernández JA, del Rio LA and Sevilla F. **1997**. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*. 114:275-284.
- Joo JH, Bae YS and Lee JS. **2001**. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*. 126:1055-1060.
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T and Tanaka K. **1999**. Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radical Research*. 31:S219-S225.
- Kampfenkel K, Van Montagu M and Inze D. **1995**. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue *Analytical Biochemistry*. 225: 165-167.
- Kang H-M and Saltveit ME. **2002**. Reduced chilling tolerance in elongating cucumber seedling radicles is related to their reduced antioxidant enzyme and DPPH-radical scavenging activity. *Physiologia Plantarum*. 115:244-250.

- Kärkönen A and Fry SC. **2006**. Effects of ascorbate and its oxidation products on H₂O₂ production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of Experimental Botany*. 57(8):1633-1644.
- Kato N and Esaka M. **1999**. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia Plantarum*. 105:321-329.
- Kato N and Esaka M. **2000**. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. *Planta*. 210:1018-1022.
- Kawakami S, Matsumoto Y, Matsunaga A, Mayama S and Mizuno M. **2002**. Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. *Plant Science*. 163(4):829-836.
- Kingston-Smith AH, Harbinson J and Foyer CH. **1999**. Acclimation of photosynthesis, H₂O₂ contents and antioxidants in maize (*Zea mays*) grown at sub-optimal temperatures. *Plant, Cell and Environment*. 22:1071-1083.
- Kobayashi F, Takumi S and Nakamura C. **2007**. Increased freezing tolerance in an ABA hypersensitive mutant of common wheat. *Journal of Plant Physiology*. En prensa.
- Kocsy G, Galiba G and Brunold C. **2001**. Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*. 113:158-164.
- Koda Y, Kikuta Y, Tazaki H, Tsujino Y, Sakamura S and Yoshihara. **1991**. Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemical*. 30:1435-1438.
- Korkmaz A. **2002**. Amelioration of chilling injuries in watermelon seedlings by abscisic acid. *The Turkish Journal of Agricultural and Forest*. 26:17-20.
- Lalk I and Dörffling K. **1985**. Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiologia Plantarum*. 63:287-292.
- Larkindale J and Knight MR. **2002**. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology*. 128:682-695.

- Lee DH, Kim YS and Lee CB. **2001**. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*. 158:737-745.
- Lee SP and Chen THH. **1993**. Molecular cloning of abscisic acid-responsive mRNAs expressed during the induction of freezing tolerance in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension culture. *Plant Physiology*. 101:1089-1096.
- Leipner J, Basilides A, Stamp P and Frachedoud Y. **2000**. Hardly increased oxidative stress after exposure to low temperature in chilling-acclimated and non-acclimated Maize leaves. *Plant Biology*. 2(2):243-252.
- León J, Lawton MA and Raskin I. **1995**. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*. 108(4):1673-1678.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R and Lamb C. **1994**. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79:583-593.
- Ligarreto MGA. **2001**. Los recursos genéticos: Un Acervo Importante para el Mejoramiento de la Producción de Papa. *Innovación y Cambio Tecnológico*. 2(1):12-17.
- López DH, Zavala QT y Cadena HM. **1985**. Obtención y conservación de genotipos de papa libres de virus. SARH Folleto Misceláneo Núm. 3
- Lopez-Delgado H and Carrillo-Castañeda G. **1996**. Acetylsalicylic acid: its effects on a highly expressed phosphatase from *Solanum cardiophyllum*. *Biotechnología Aplicada*. 13:186-189.
- López-Delgado H and Scott IM. **1996**. Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *Journal of Plant Physiology*. 151:74-78.
- López-Delgado H, Dat JF, Foyer CH and Scott IM. **1998a**. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany*. 49(321):713-720.
- López-Delgado H, Jimenez-Casas M and Scott IM. **1998b**. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetyl salicylic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54(3):145-152.

- López-Delgado H, Mora-Herrera ME, Zavaleta-Mancera HA, Cadena-Hinojosa M and Scott IM. **2004**. Salicylic acid enhanced heat-tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal of Potato Research*. 81:161-166.
- López-Delgado H, Zavaleta-Mancera HA, Mora-Herrera ME, Vázquez-Rivera M, Flores-Gutiérrez F and Scott I. **2005**. Hydrogen peroxide increases potato tuber and stem starch content, stem diameter, and stem lignin content. *American Journal of Potato Research*. 82:279-285.
- López-Delgado HA, Scott IM, and Mora-Herrera ME. **2007**. Stress and antistress effects of salicylic acid and acetyl salicylic acid on potato culture technology. In Hayat S. and Ahmad A. ed. *Salicylic acid a plant hormone*. Netherlands Springer Press pp.163-195.
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Jonson B, Graham IA and Baker A. **2000**. Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal*. 19(24):6770-6777.
- Lum HK, Butt YKC and Lo SCL. **2002**. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Biology and Chemistry*. 6(2):205-213.
- Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S and Foyer CH. **2005**. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 56(411):417-423.
- MacRae EA and Ferguson IB. **1985**. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. *Physiologia Plantarum*. 65:51-56.
- Mallick N and Mohn FH. **2000**. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*. 157:183-193.
- Mäntylä E, Lang V and Palva ET. **1995**. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 107:141-148.

- Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC and Becana M. **2003**. Biochemistry and Molecular Biology of Antioxidants in the Rhizobia-Legume Symbiosis. *Plant Physiology*. 133:499-509.
- McClung CR. **1997**. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine*. 23(3):489-496.
- Mehdy MC, Sharma YK, Sathasivan K and Bays NW. **1996**. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*. 98:365-374.
- Mehlhorn H, Lelandais M, Korth HG and Foyer CH. **1996**. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters*. 378:203-206.
- Minami A, Nagao M, Arakawa K, Fujikawa S and Takezawa D. **2003**. Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *Journal of Plant Physiology*. 160:475-483.
- Mittler R and Zilinskas BA. **1993**. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*. 212:540-546.
- Mittler R. **2002**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7(9):405-410.
- Mizuno M, Kamei M and Tsuchida H. **1998**. Ascorbate peroxidases and catalase cooperative for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low temperature storage. *Biochemistry and molecular biology international*. 44(4):717-726.
- Mohapatra SS, Poole RJ and Dhindsa RS. **1988**. Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiology*. 87:468-473.
- Mora Herrera ME y López Delgado H. **2006**. Tolerancia a baja temperatura inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29(2):81-85.

- Mora Herrera ME. **1991**. Efectos del ácido acetil salicílico en el crecimiento de yemas axilares de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro*. Tesis de licenciatura Bióloga. Facultad de Ciencias. UNAM. pp 115.
- Mora Herrera ME. **2002**. Inducción de tolerancia a baja temperatura de plantas de *Solanum tuberosum* L. (papa) mediadas por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. pp.90.
- Mora-Herrera ME and López-Delgado H. En prensa. Freezing tolerance and antioxidant activity in potato microplants induced by abscisic acid treatment. *American Journal of Potato Research*.
- Mora-Herrera ME, López-Delgado H, Castillo-Morales A and Foyer CH. **2005**. salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiologia Plantarum*. 125:430-440.
- Mori IC and Schroeder JI. **2004**. Reactive Oxygen Species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*. 135:702-708.
- Murashige T and Skoog F. **1962**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473- 497.
- Murata N and Los DA. **1997**. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology*. 115:875-879.
- Murata Y, Pei Z-M, Mori IC and Schroeder JI. **2001**. Abscisic acid activation of plasma membrane c channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* y *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *The Plant Cell*. 13:2513-2523.
- Nakano Y and Asada K. **1981**. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22(5):867-880.
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E and Jacquot J-P. **2007**. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 129:185-195.

- Neill SJ, Desikan R and Hancock J. **2002b**. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5(5):388-395.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst DR and Hancock JT. **2002a**. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53 (372):1237-1247.
- Niebel A, Heungens K, Barthels N, Inzé D, Van Montagu M and Gheysen G. **1995**. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*. 8(3):371-378.
- Noctor G and Foyer CH. **1998**. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:249-279.
- O'Kane D, Gill V, Boyd P and Burdon RH. **1996**. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*. 198:366-370.
- Örvar BL, Sangwan V, Omann F and Dhindsa R. **2000**. Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*. 23:785-794.
- Ougham HJ. **1987**. Gene expression during leaf development in *Lolium temulentum* patterns of protein in the synthesis in response to heat-shock and cold-shock. *Physiologia Plantarum*. 70:479-484.
- Pastori G, Foyer CH and Mullineaux P. **2000**. Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cell of maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 51(342):107-113.
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veijovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G and Foyer CH. **2003**. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*. 15:939-951.
- Payton P, Webb R, Korniyev D, Allen R and Holaday AS. **2001**. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing

- chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany*. 52 (365):2345-2354.
- Pearce RS. **2001**. Plant Freezing and Damage. *Annals of Botany*. 87:417-424.
- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E and Schroeder JI. **2000**. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*. 406:731-734.
- Peltzer D and Polle A. **2001**. Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): responses to light and temperature. *Physiologia Plantarum*. 111:158-164.
- Pignocchi C and Foyer CH. **2003**. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:379-389.
- Pignocchi C, Kiddle G, Hernández I, Foster SJ, Asense A, Taybi T, Barnes J and Foyer CH. **2006**. Ascorbate-oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiology*. 141:423-435.
- Pignocchi C, Pletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD and Foyer CH. **2003**. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*. 132:1631-1641.
- Polidoros AN and Scandalios JG. **1999**. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*. 106(1):112-120.
- Polle A. **1997**. Defense against photooxidative damage in plants. In: oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbour Laboratory Press. pp 623-666.
- Pospisilova J, Synkova H, Haisel D, Catsky J, Wilhelmova N and Sramek F. **1999**. Effect of elevated CO₂ concentration on acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Journal of Experimental Botany*. 50:119-126.
- Prasad KT. **1996**. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system,

- oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *The Plant Journal* 10(6):1017-1026.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA and Stewart CR. **1994a**. Evidence for chilling – induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*. 6: 65-74.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA and Stewart CR. **1994b**. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiology*. 105:619-627.
- Prasad TK. **1997**. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-Emergent maize seedlings. *Plant Physiology*. 114:1369-1376.
- Pruvot G, Massimino J, Peltier G and Rey P. **1996**. Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*. 97(1):123-131.
- Rao MV, Paliyath G and Ormrod DP. **1996**. Ultraviolet-B- and ozone-induce biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 110:125-136.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP and Watkins CB. **1997**. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂–metabolizing enzymes. *Plant Physiology*. 115:137-149.
- Ristic Z, Yang G, Sterzinger A and Zhang L. **1998**. Higher chilling tolerance in maize is not always related to the ability for greater and faster abscisic acid accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 153:154-162.
- Robertson AJ, Reaney MJT, Wilen RW, Lamb N, Abrams SR and Gusta LV. **1994**. Effects of abscisic acid metabolites and analogs on freezing tolerance and gene expression in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) cell cultures. *Plant Physiology*. 105:823-830.
- Roca WM, Chavez R, Martín ML, Arias DI, Mafla G and reyes R. **1989**. *In vitro* methods of germ-plasm conservation. *Genome*. 31:813-817.
- Roca WM, Hidalgo R and Alvarez G. **1982**. Genetic resources unit. Annual report. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 29-36.

- Rock C. **2000**. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *The New Phytologist*. 148:357-396.
- Rojas-Beltran JA, Dejaeghere F, Abd Alla Kotb M and Du Jardin P. **2000**. Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research*. 43:383-393.
- Ros Bárcelo A. **1998**. Hydrogen peroxide is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Annals of Botany Company*. 82:97-103.
- Rubio COA, Rangel GJA, Flores LR, Magallanes GJV, Díaz HC, Zavala QTE, Rivera PA, Cadena HM, Rocha RR, Ortiz TC, López DH, Días VM y Paredes TA. **2000**. Manual para la producción de papa en las Sierras y Valles altos del centro de México. SAGAR.INIFAP.CIRCE. Campo experimental Valle de Toluca. Libro Técnico No. 1 481 p
- SAGARPA INIFAP. **1997**. Programa Nacional de Investigaciones en el cultivo de la papa. INIFAP. México. Pub. Esp. No. 13, abril, p17-38.
- Sahoo R, Kumar S and Ahuja PS. 2001. Induction of a new isozyme of superoxide dismutase at low temperature in *Potentilla astrisanguinea* Lodd. Variety argyrophylla (Wall. Ex. Lehm) Griens. *Journal of Plant Physiology*. 158:1093-1097.
- Sairam RK and Srivastava GC. **2000**. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*. 43(3):381-386.
- Salisbury FB and Ross CW. **1994**. Hormonas y reguladores del crecimiento: citocininas, etileno, ácido abscísico y otros compuestos. En Fisiología vegetal. Iberoamérica. Mexico. pp 423-451.
- Sánchez GE, Slack SA and Dodds JH. **1991**. Response of selected *Solanum* species to virus eradication therapy. *American Journal of Potato Research*. 68:299-315.
- Sánchez Rojo S. **2006**. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la inducción de tuberización *in vitro* en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Biólogo. Facultad de Ciencias. UAEM. pp 57.

- Sanmartin M, Drogouti PD, Lyons T, Barnes J and Kanellis AK. **2003**. Over expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*. 216:918-928.
- Santos I, Pires H, Almeida JM, Fidalgo F, Confraria A, Duarte M, Borlido J and Salema R. **2006**. Phylogenetic relationship of potato *CAT1* and *CAT2* genes, their differential expression in non-photosynthetic organs and during leaf development, and their association with different cellular processes. *Functional Plant Biology*. 33(7):639-651.
- Sato Y, Muraskami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H and Tanida M. **2001**. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedling. *Journal of Experimental Botany*. 52:145-151.
- Scandalios JG. **2002**. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*. 27(9):483-486.
- Scandalios JG. **2005**. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:995-1014.
- Scebba F, Sebastiani L and Vitagliano C. **1998**. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum*. 104(4):747-752.
- Scott IM, Dat JF, López-Delgado H and Foyer CH. **1999**. Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signaling in plants. *Plant Physiology*. 39:13-17.
- Senaratna T, Touchell D, Bunn E and Dixon K. **2000**. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*. 30:157-161.
- Seppänen MM, Cardi T, Hyökki MB and Pehu E. **2000**. Characterization and expression of cold-induced glutathione S-transferase in freezing tolerant *Solanum commersonii*, sensitive *S. tuberosum* and their interspecific somatic hybrids. *Plant Science*. 153:125-133.

- Sgherri C, Milone MT, Clijsters H and Navari-Izzo F. **2001**. Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to subsymptomatic copper doses. *Journal of Plant Physiology*. 158:1439-1447.
- Shalata A and Neumann PM. **2001**. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*. 52(364):2207-2211.
- Sharp RE and LeNoble ME. **2002**. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*. 53(366):33-37.
- Sharp RE, LeNoble ME, Else MA, Thorne ET and Gherardi F. **2000**. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: Evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*. 51:1575-1584.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y and Yoshimura K. **2002**. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. 53(372):1305-1319.
- SICA. **2000**. Servicio de información agropecuaria del ministerio de agricultura y ganadería del Ecuador.
- Smirnoff N. **2000**. Ascorbic acid: metabolism and function of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:229-235.
- Smirnoff N and Wheeler GL. **2000**. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in plant sciences*. 19:267-290.
- Spollen WG, LeNoble ME, Sanmels TD, Bernstein N and Sharp RE. **2000**. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*. 122:967-976.
- Srivastava MK and Dwivedi UN. **1998**. Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *Journal of Plant physiology*. 153(3-4):409-414.
- Srivastava S, Rahman MH, Shah S and Kav NNV. **2006**. Constitutive expression of the pea ABA-responsive 17 (ABR17) cDNA confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*. 4(5):529-549.
- Szalai G, Janda T, Páldi E and Szigeti Z. **1996**. Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *Journal of Plant Physiology*. 148:378-383.

- Tamminen I, Mäkelä P, Heino P and Palva ET. **2001**. Ectopic expression of *ABI3* gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 25(1):1-8.
- Thomashow MF. **1998**. Role of Cold-Responsive Genes in plant Freezing Tolerance. *Plant Physiology*. 118:1-7.
- Thomashow MF. **1999**. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:571-599.
- Tseng MJ and Li PH. **1991**. Changes in protein synthesis and translatable messenger RNA populations associated with ABA-induced cold hardiness in potato (*Solanum commersonii*). *Physiologia Plantarum*. 81(3):349-358.
- Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF and Inze D. **2001**. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 161:405-414.
- van der Schild JHW. **1981**. History of potato storage. In: Storage of potatoes. A. Rastovski and A. van Es (eds.) Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. 3-13.
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M, Inze D and Van Breusegem F. **2003**. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:16113-16118.
- Vranová E, Inze D and Van Breusegem F. **2002**. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. 53:1227-1236.
- Warm E and Laties GG. **1982**. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry*. 21:827-831.
- Wiersema SG. **1986**. A method of producing seed tubers from true potato seed. *Potato Research*. 29:225-237.
- Wilkinson S, Clephan AL and Davies WJ. **2001**. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiology*. 126:1566-1578.

- Willekens H, Inzé D, van-Montagu M and van-Camp W. **1995**. Catalases in plants. *Mol Breeding*. 1:207-228.
- Willekens H, Langebartels C, Tire C, van Montagu M, Inze D and van Camp V. **1994**. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:10450-10454.
- Wolf JA. **1987**. The potato in the human diet. Cambridge University. Press Cambridge. 246 p.
- Woodbury W, Spencer AK and Stahmann MA. **1971**. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalasa isozymes. *Analytical Biochemistry*. 44:301-305.
- Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S and Nassuth A. **2006**. Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell and Environment*. 29:1410-1421.
- Xin Z and Li PH. **1993a**. Relationship between proline and abscisic acid in the induction of chilling tolerance in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiology*. 103(2):607-613.
- Xin Z and Li PH. **1993b**. Alteration of gene expression associated with abscisic acid-induced chilling tolerance in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiology*. 101:277-284.
- Xiong L and Zhu JK. **2002**. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 25:131-139.
- Xiong L, Ishitani M and Zhu J-K. **1999**. Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 119:205-211.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H and Zhu JK. **2001**. The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold-stress-and osmotic stress-responsive gene expression. *The Plant Cell*. 13:2063-2083.
- Xiong L, Schumaker KS, and Zhu JK. **2002**. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*. S165-S183.

- Yamaguchi K, Mori H and Nishimura M. **1995**. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant and Cell Physiology*. 36:1157-1162.
- Yoshida K, Igarashi E, Mukai M, Hirata K and Miyamoto K. **2003**. Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid. *Plant, cell and Environment*. 26:451-457.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T and Shigeoka S. **2000**. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*. 123: 223-233.
- Zacarías L y Lafuente MT. **2000**. Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto J. y Talon M. editores. Ed. McGraw-Hill Interamericana Madrid España. pp 361-375.
- Zhang X, Miao YC, An GY, Zhou Y, Shangguan ZP, Gaon JF and Song CP. **2001b**. K⁺ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells. *Cell Research*. 11:37-43
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW and Song Ch-P. **2001a**. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*. 126:1438-1448.
- Zhou B, Guo Z and Liu Z. **2005a**. Effects of abscisic acid on antioxidant systems of *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. under chilling stress. *Crop Science*. 45:599-605.
- Zhou B, Guo Z, Xing J and Huang B. **2005b**. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany*. 56(422):3223-3228.

VII. ANEXOS

ANEXO 1. MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (1962, MS).

Soluciones para el Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

SOLUCIÓN	g/L
Sales	4.4
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.37
Inositol	0.1
Hierro (Fe)	0.065
Tiamina	0.0004
Pantotenato de calcio	0.002
Glicina	0.00005
Sacarosa	30
Fitagel	2.25

Notas:

- 1.- Se afora la solución con agua destilada.
- 2.- Se calibra el pH a 5.6 a 5.7 con hidróxido de potasio KOH.
- 3.- Se agrega o fitagel y se disuelve con calor.
- 4.- Se vacía en los recipientes y se esteriliza.

Composición química y cantidades requeridas para las sales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

Reactivo	Fórmula	Cantidad para 1000 ml
Nitrato de amonio	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	17.5 g
Nitrato de potasio	KNO_3	20 g
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.5 g
Fosfato de potasio	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	1.75 g
Ácido bórico	$\text{H}_3 \text{BO}_3$	50 mg
Sulfato de manganeso	Mn SO_4	200 mg
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg
Yoduro de potasio	KI	10 mg
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4$	2.5 mg
Sulfato cúprico 5.0 mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}^*$	0.5 mL de la solución preparada.
Cloruro de cobalto 5.0 mg	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	

***Nota** de estas sustancias se pesan 5 mg de cada una y se disuelven en agua destilada y se aforan a 10 mL y se toma 0.5 mL para 1 litro.

Soluciones concentradas para la preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

Solución	Cantidad	Observaciones.
Sulfato de Magnesio	3.7 g en 100 mL de agua destilada.	
Hierro	EDTA 0.75 g Sulfato ferroso 0.55 g	Estos se disuelven en 20 mL de agua destilada cada uno. El EDTA se calienta para disolverse. Después ambos se aforan a 100 mL.
Tiamina	40 mg en 100 mL de agua destilada	
Inositol	1.0 g en 100 mL de agua destilada	
Pantotenato de calcio	100 mg en 100 mL de agua destilada	Congelar.
Glicina	10 mg/100 mL de agua destilada.	

ANEXO 2. GEL NATIVO PARA ACTIVIDAD DE LA CATALASA.

Soluciones

Acrilamida (solución de acrilamida 40% [37.5 %T:1%C])

Acrilamida pesar 19.48 g de acrilamida y 0.52 g de bis acrilamida en (aforar) 50 mL de agua (pesar ambos dentro de la campana de extracción, con guantes y cubre boca, una vez terminado se desechan guantes y cubre boca) estos productos son muy peligrosos seguir las indicaciones. Se filtra y se guarda en refrigeración (en todos los casos se usa agua destilada).

Amortiguador gel separador

Tris 1.5 M pH 8.8. Para 50 mL se pesan 9.06 g de TRIS se lleva a 45 mL, se calibra el pH a 8.8 con HCl concentrado, se afora a 50 mL y se guarda a 4°C.

Amortiguador gel concentrador

Tris 0.5 M pH 6.8. Se pesan 3 g de Tris en 45 mL de agua. Se ajusta el pH a 6.8 con HCl concentrado, finalmente se afora a 50 mL y se almacena a 4°C.

Persulfato de amonio al 10 %

20 mg de persulfato de amonio en 200 µL. Esta solución se prepara el día que se va a usar.

Amortiguador de extracción.

Amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.8

EDTA 1 mM

PMSF 1 mM

PVP 2 %

DTT 10 mM

Solución concentrada

1.874 mL 0.1 M

20 µL 0.1 M

40 µL 0.2 M

40 mg Polvo

66.6 µL 0.3 M

Amortiguador de carga 1 mL.

H₂O destilada

260 µL

Tris 0.5 M pH 6.8

125 µL

Glicerol (50%)

400 µL

Azul de Bromofenol (0.5%)

15 µL

DTT 60 mM

200 µL 0.3 M

Este amortiguador se agrega a la muestra en una proporción 1:7 a 1:10.

Amortiguador de corrida 5x

Tris (25 mM) 7.5 g y Glicina (1.9 M) 37 g, se llevan a 500 mL de agua 5X. Para correr el gel se agregan 100 mL del amortiguador de corrida en 500 mL de agua.

PREPARACIÓN DE LOS GELES

Gel 6% recomendable		
Solución	Separador 6%	Concentrador 4%
H ₂ O destilada	8.975 mL	4.86 mL
Resolving	3.75 mL	-----
Stacking	-----	1.87 mL
Acrilamida	2.25 mL	0.75 mL
Desgasificar (15 min)	Desgasificar	desgasificar
Persulfato de amonio al 10 %	8 µL	75 µL
Temed	7.5 µL	10 µL
Volumen final	15 mL	7.5 mL

La electroforesis se corre durante 18-20 horas a 20 volts a 4°C.

ANEXO 3. CALIBRACIÓN DEL MARCADOR DE ALTO PESO MOLECULAR.

Para conocer el peso molecular de las isoenzimas de catalasa, se utilizó el marcador de alto peso molecular para geles nativos (Amersham Biosciences), que contenía:

Tiroglobulina	669	kDa	76 μ g
Ferritina	440		50
Catalasa	232		36
Lactato deshidrogenasa	140		48
Albúmina sérica de bovino	66		40

El marcador se resuspendió en 100 μ L de amortiguador de extracción para catalasa (amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.8, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, DTT 10 mM y PVP 2%) y se corrieron en las mismas condiciones del gel nativo para la actividad de la catalasa, adicionalmente se corrieron muestras de los tratamientos con sus testigos. Se probaron diferentes concentraciones de proteína y diluciones del marcador de alto peso molecular. Se reveló con azul de Coomassie y con tinción de plata para identificar todas las bandas. Una vez obtenida la calibración se usaron como marcador para conocer el peso molecular de las isoenzimas de catalasa encontradas en papa.

Tinción de Plata

Finalizada la electroforesis el gel se sumergió en las siguientes soluciones para su tinción: 30 minutos en 40% de metanol y 10% de ácido acético para su fijación, 30 minutos en 50% de metanol, 12% de ácido tricloroacético (TCA) y 2 % de cloruro cúprico (CuCl_2), 15 minutos en 10% de etanol, 5% de ácido acético, 5 minutos en 0.000005 % de permanganato de potasio, 5 minutos en 10% de etanol 5% ácido acético, 5 minutos en 10% de etanol, 5 minutos en agua destilada para enjuague, 15-20 minutos en 0.2% de nitrato de plata (AgNO_3), 20 segundos en agua destilada, 1 minuto en 10% de carbonato de potasio (K_2CO_3). El revelado del gel se obtuvo en una solución de 2% de carbonato de potasio y 0.025% de formaldehído por algunos minutos. La reacción se finalizó en una solución de 10% de etanol 5% ácido acético, las bandas se observaron en intensidades naranjas y marrón.

Tinción de azul de Coomassie

Finalizada la electroforesis el gel se tiñó con Azul de Coomassie durante 20 minutos. Para obtener el revelado de las bandas, el gel se destiñó varias veces con una solución de 40% metanol y 20% de ácido acético.

ANEXO 4. RECUPERACIÓN DE MICROPLANTAS PREINCUBADAS EN ABA EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

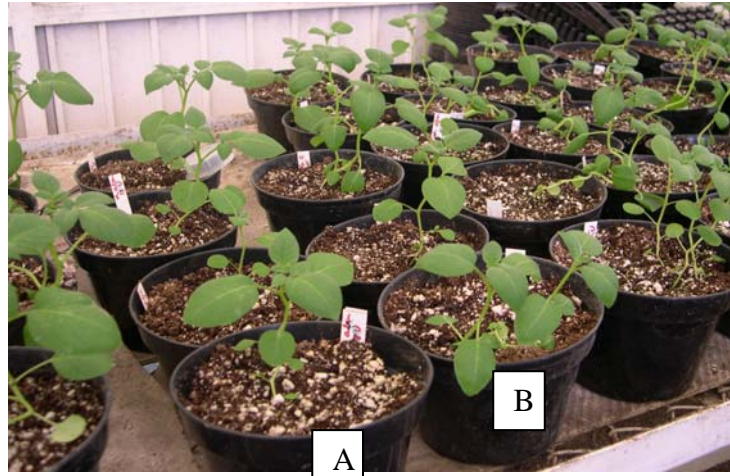


Figura 22. Crecimiento de plantas de papa previamente incubadas en 0 (A, control) y 10 μ M de ABA (B) a los 30 días de cultivo en condiciones de invernadero.



Figura 23. Recuperación en invernadero de microplantas pretratadas con 0 (A, control) y 10 μ M (B) de ABA, después de 15 días del trasplante en suelo y exposición al frío por 4 horas.

ANEXO 5. REACTIVOS

REACTIVO	FÓRMULA	MARCA
Ácido abscísico	C ₁₅ H ₂₀ O ₄ Isomero (±) cis-trans	Sigma
Ácido acético	CH ₃ COOH	Baker
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Sigma
Ácido clorhídrico	HCl	Baker
Acido Giberélico (GA3)	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	Sigma
Acido tricloroacetico TCA	Cl ₃ CCOOH	Baker
Acrilamida (Acrylamide)	C ₃ H ₅ NO	Sigma
Agar-AGAR (POLVO)	-----	Meyer
Agarosa	Galactosas Alpha y Beta	Bioline
Albúmina sérica de bovino (BSA)	-----	Sigma
Ascorbato oxidasa	-----	Sigma
Azul de Coomassie (Coomasie Satín G-250 stain)	-----	Bio Rad
Azul de bromofenol	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	Hycel
Bis-Acrilamida N,N'Metileno-bis-acrilamida	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	Sigma
Carbonato de potasio	K ₂ CO ₃	Baker
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	Baker
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	Baker
Cloruro cúprico	CuCl ₂	Baker
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ . 6H ₂ O	Baker
Cloruro de potasio	KCl	Baker
Cloruro ferrico	FeCl ₃ .6H ₂ O	Baker
DTT Dithiothreitol	(D,L)-1,4-Dithiothreitol	Bio Rad
Dowex resina 1 x 10	Forma Cl ⁻ ; malla 50-100.	Fluka
Etanol	CHCl ₃	Merk
EDTA (Na ₂ EDTA) sal disódica del ácido etilen dinitrilo tetracético	C ₁₀ H ₁₄ Na ₂ N ₂ O ₈ .2H ₂ O	Baker

Ferricianuro de potasio	$K_3Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	Baker
Ferrocianuro de potasio	$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	Baker
Fitagel (Phytigel)	-----	Sigma
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	Baker
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	Baker
Fosfato de sodio dibásico	Na_2HPO_4	Baker
Fosfato de sodio monobásico	$Na H_2PO_4 \cdot H_2O$	Baker
Formaldehído	CH_2O	Baker
Glicerol	$C_3H_5(OH)_3$	Baker
Glicina	$C_2H_6NO_2$	Merck y Bio Rad
Guaiacol	$C_7H_8O_2$	Sigma
Hidróxido de amonio	NH_4OH	Merk
Hidroxido de potasio	KOH	Baker
Inositol	$C_6H_{15}O_{15}P_3$	Merk
Luminol	$C_8H_7N_3O_2$	Sigma
Marcador de alto peso	De 669 a 66 kDa (5 bandas)	Amersham Biosciences
Metanol	CH_3OH	Fermont
Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Baker
Myo-Inositol	$C_6H_{12}O_6$	Sigma
Nitrato de amonio	NH_4O_3	Baker
Nitrato de potasio	KNO_3	Baker
Nitrato de plata	$AgNO_3$	Baker
D-Pantotenato de calcio	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Fluka
Persulfato de amonio	$H_8N_2O_8S_2 / (NH_4)_2S_2O_8$	Bio Rad
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2 al 30%	Baker
PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride)	$C_6H_5CH_2SO_2F$	Sigma
Perclorato	$HClO_4$	Baker

Permanganato de potasio	KMnO_4	Baker
PVP Polyvinylpyrrolidone	PVP Povidone	Sigma
Reactivo de Bradford	-----	Bio Rad
Resina Dowex)(-1 x 10)	-----	Fluka
Sacarosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Baker
Sulfato cúprico	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Baker
Sulfato manganoso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Baker
Sulfato de magnesio (7-Hidrato, cristal)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Baker
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Baker
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Baker
Temed (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	Bio Rad
Tiamina Diclorato	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Merck
Tris (hydroxymethyl)-aminomethane	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	Bio Rad
Tween	Tween 20	Boehringer Mannheim
Yoduro de potasio	KI	Baker

ANEXO 6. EQUIPO.

Equipo	Marca y/o especificaciones
Autoclave	Horizontal; Marke Forge
Baño maría	Lambet
Campana de flujo laminar	Edge Gard The Baker Company.
Centrifugas	Mini spin plus Eppendorf
Columnas de cromatografía líquida	Sigma
Congelador	Coldspt
Equipo de electroforesis	Mini protein II Bio Rad
Espectrofotómetro	Jenway modelo 6405 UV/vis.
Luminómetro	Optocomp-p MGM instruments
Potenciómetro	pH meter orion Modelo 4202