



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

ACTIVIDAD PEROXIDASA Y SU RELACION CON LA
ACLIMATIZACION EN PLANTULAS DE PAPA
(*Solanum tuberosum*) VAR. TOLLOCAN, CULTIVADAS
in vitro.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

REYNA VALDES MARIO

ASESOR: M. en C. GERARDO ORTIZ MONTIEL



TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO

FEBRERO 2002



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.



U.N.A.M. CAMPUS

**Actividad Peroxidasa y su relación con la aclimatización en
plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) Var. Tollocan,
cultivadas *in vitro*.**

DEDICATORIA

Mi más sincera gratitud y reconocimiento para aquellas personas que me brindaron el principal don que es la vida, mis padres:

Mario R.: Por el ejemplo de entrega al trabajo.

Rosa María V.: Por darme la motivación a seguir superándome cada día.

A mis hermanos.

Claudia, Marco Antonio y Dulce María: Por su apoyo incondicional, durante todo este largo trayecto de mi vida y por todos los momentos que hemos compartido juntos.

A mis sobrinos.

Sandra Itzel, Aldo y Omar Alejandro: Que son la base y futuro de la familia.

"Gracias a Dios y a ustedes que fueron parte central de mi vida profesional y humana."

AGRADACIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, especialmente a todos los profesores de Biología que de alguna manera contribuyeron a mi formación profesional.

Al laboratorio de cultivos de tejidos vegetales de la FES-Iztacala.

Especialmente agradezco a mi director de tesis M. en C. Gerardo Ortiz Montiel, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y haber depositado su confianza en mí, para concluir la presente investigación.

A mis revisores: M. en C. Ernesto Aguirre, Biol. Manuel Mandujano, M en C. Socorro Sánchez y M. en C. Ismael Aguilar, por las sugerencias y comentarios muy acertados para el enriquecimiento del presente trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, por todo el tiempo que compartimos juntos durante el trabajo.

Y a todas aquellas personas que confiaron en mí y que se consideren amigos míos les agradezco su amistad, sobre todo al club de la mascarita y a los del vaso blanco.

INDICE

Abreviaturas.	1
Resumen.	2
I.- Introducción.	4
II.- Revisión de literatura.	5
2.1.- La planta de papa.	5
2.2.- Clasificación Botánica.	5
2.3.- Descripción.	6
2.4.- Propagación.	7
2.5.- Micropropagación.	7
2.5.1.- Etapas de la micropropagación.	8
2.5.2.- Factores que influyen en la micropropagación.	9
2.6.- Aclimatización.	10
2.7.- Peroxidasas y Biosíntesis de lignina.	10
2.8.- Justificación.	15
III.- Objetivos.	16
IV.- Materiales y Métodos.	17
4.1.- Material Biológico.	17
4.2.- Preparación del medio de cultivo y multiplicación.	17
4.3.- Condiciones del cultivo.	17
4.4.- Actividad peroxidasa en plántulas de papa cultivadas <i>in vitro</i>	17
4.5.- Actividad peroxidasa y sobrevivencia de plántulas de papa, durante el proceso de aclimatización.	18

4.6.- Determinaciones analíticas.	19
V.- Resultados y Discusión.	20
5.1.- Actividad peroxidasa en plántulas de papa cultivadas <i>in vitro</i>	20
5.2.- Actividad peroxidasa y sobrevivencia de plántulas de papa, durante el proceso de aclimatización.	24
VI.- Conclusiones.	33
VII.- Sugerencias.	34
VIII.- Bibliografía.	35

Abreviaturas.

ABTS	2,2'- azino-bis-[ácido 3-etilbenztiazolin-6-sulfónico]
AIA	Ácido indolacético
D.O.	Densidad óptica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Lb	Libras de presión
M	Molar
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
MS62	Medio Murashige y Skoog, 1962
N	Normal
nm	Nanometros
pI	Punto Isoeléctrico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
μl	Microlitros
μmol	Micromolar
W	Watts
w/v	concentración (peso / volumen)

Resumen.

La papa (*Solanum tuberosum*) es una de las especies más importantes para la alimentación humana, así como también, es el cultivo alimenticio al cual se le ha aplicado en forma más amplia la biotecnología en sus múltiples modalidades, dentro de las cuales, el cultivo *in vitro* es la más aceptada convirtiéndose en una herramienta útil para realizar estudios bioquímicos, fisiológicos y anatómicos con el objeto de entender señalamientos de lo que ocurre en las plantas, como es el caso particular del funcionamiento de una familia de enzimas conocidas como peroxidasas, considerando que una de sus principales funciones se relaciona con la síntesis de ligninas como parte de la estructura principal de la planta. En el presente trabajo se determinó la actividad de las peroxidasas en fracciones de proteínas solubles y unidas a pared celular en plántulas de papa sembradas en medios de cultivos estériles con distintas concentraciones de sacarosa y bajo condiciones de iluminación y temperatura controladas. Las plántulas se trasladaron posteriormente a suelo de acuerdo a diferencias encontradas en la actividad de peroxidasa, para su proceso de aclimatización, durante el cual se les determinó la actividad enzimática, así como su porcentaje de sobrevivencia. Los resultados muestran que la actividad de peroxidasa unida a pared celular fue mayor que la actividad presentada de peroxidasa solubles, sobre todo en plántulas pretratadas con 3 y 6 % (w/v) de sacarosa, concentraciones que influyeron sobre la aparición de raíces. Durante el proceso de aclimatización la actividad enzimática fue mayor en raíces que en vástagos de plántulas que fueron igualmente pretratadas con 3 y 6 % (w/v) de sacarosa e incubadas *in vitro* durante 15 días, encontrándose una correlación positiva entre una elevada concentración de sacarosa con el peso fresco del tejido *in vitro* el cual persistió durante el proceso de aclimatización, lo que permitió que los cultivos pretratados

con 3 y 6 % (w/v) de sacarosa presentaran un 100 % de sobrevivencia durante todo el periodo de aclimatización. Lo anterior sugiere que la actividad de peroxidasa unida a pared depende fuertemente de la concentración de sacarosa en el medio, existiendo una correlación entre la actividad de peroxidasa unida a pared y el mejoramiento en la aclimatización de la planta a suelo.

I. Introducción.

Ante el reto que representa el aumento sostenido de la población, se tiene que responder con mayor producción de alimento. A pesar de que se cuenta con cultivares de alto rendimiento, la producción agrícola está fuertemente limitada por factores que se agravan día con día. En México, solo un 15 % del territorio nacional presenta suelos adecuados para la agricultura. Este panorama hace prioritarias las investigaciones sobre especies de importancia alimenticia (Saad, 1994).

El cultivo de papa es considerado como uno de los alimentos más importantes del mundo después del arroz, trigo y maíz (Ortiz, 2000; Maldonado, 1994; Ortiz, 1986), y hoy en México es estimado como un alimento básico, así como en muchos países desarrollados como Inglaterra, Holanda, Alemania y Suecia (Saad, 1994).

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las especies más importantes para la alimentación humana, ya que presenta dos características notables: un excelente valor nutricional y un alto rendimiento por hectárea. Esta planta de fácil digestión y delicioso sabor, tiene proteínas de alta calidad por su contenido de aminoácidos esenciales, y un alto porcentaje de carbohidratos (Maldonado, 1982; Saad, 1994), y desde el punto de vista agrícola, produce mayor cantidad de alimento por unidad de superficie que cualquier otro cultivo, además, la papa es el primer cultivo alimenticio al cual se le ha aplicado en forma más extensiva la biotecnología en sus diferentes modalidades. Dentro de estas alternativas biotecnológicas el cultivo de tejidos es una de las más importantes en la última década (Ortiz, 2000), por lo que la biotecnología, a través de la técnica de cultivos de tejidos vegetales trabaja para encontrar respuestas a las demandas específicas y así satisfacer las necesidades de la población (Maldonado, 1994), obteniendo grandes beneficios a corto, mediano y largo plazo con aplicaciones en la agricultura, industria y farmacología (Primo, 1996).

En papa se utilizan comúnmente múltiples medios de cultivos propuestos para la propagación clonal, y existen medios definidos como específicos para la multiplicación de esta planta en documentos técnicos del Centro Internacional de la papa (CIP) (Ortiz, 2000), el cual, tiene por objeto conservar la diversidad de esta especie, en él, las distintas variedades de papa son evaluadas y conservadas en bancos de germoplasma donde permanecen disponibles para los agricultores de todo el mundo (Hellergren y Li, 1987).

El cultivo *in vitro* se ha utilizado como un sistema modelo para el estudio sobre aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y problemas relacionados con las plantas, de tal forma que puede ser usado como una herramienta útil para responder y entender cuestiones referentes al metabolismo de plantas completas, como es el caso particular de las enzimas peroxidasas de la planta de papa, cuya función es catalizar la oxidación de moléculas

mediante el peróxido de hidrógeno, aunque se considera que su principal función se refiere a la síntesis de lignina y endurecimiento de la pared celular, también tiene un papel importante en el catabolismo de AIA y la acción de defensa hacia invasiones de patógenos (Van Huystee, 1987).

II.- Revisión de literatura.

2.1.- La planta de papa.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las plantas alimenticias económicamente más importantes del mundo (Doods *et al*, 1991), originaria de las altas altitudes de las montañas de los Andes entre la intersección de los países de Chile, Perú y Bolivia, e introducida a Europa por los españoles en 1570 (Sobrino, 1992; Langer, 1991).

Estas plantas se adaptan a diversos suelos y climas, de hecho se cultivan en todo el mundo, a excepción de las regiones tropicales bajas. Son resistentes y maduran en poco tiempo por lo que pueden cultivarse hasta una latitud Norte de 60° y a alturas incluso de 2400 m.s.n.m, pero prosperan mejor en lugares en los que durante la estación de crecimiento prevalecen condiciones frescas y húmedas, con una temperatura media anual de 4.5 a 10°C y un suelo fértil y poco compacto (Hill, 1965).

2.2.- Clasificación Botánica.

De acuerdo a los caracteres florales, la planta de papa ha sido clasificada de la siguiente manera:

Familia : Solanaceae
Género : Solanum
Subgénero : Pachystemonun
Sección : Tuberarium (Potata)
Subsección : Hyperbasarthum (Patatoe)

El nombre latino de la papa, *Solanum tuberosum*, fue dado en (1596) por el botánico Gaspar Bahui. La papa suele ser clasificada en niveles de ploidía. El juego de cromosomas de la papa consta de 12 (Humán, 1986, citado por Flores, 1993). Las especies cultivadas

casi siempre son tetraploides ($2n = 48$), mientras que las silvestres predominan las diploides (Sarli, 1980).

2.3.- Descripción.

La papa es una especie criptófita, erecta, herbacea, ramosa, más o menos desarrollada, cultivada como anual por sus órganos aéreos y vivas por los tubérculos, cuya altura de la planta oscila entre 60 – 80 cm. Tallos aéreos herbáceos, cuando jóvenes erguidos, lisos y cilíndricos, en estado adulto, más o menos cuadrado, vellosos, ramificado, que con frecuencia lleva en sus ángulos alas membranosas (Sobrino, 1992). La coloración que presenta es de color verde, aunque algunas veces pueden ser de color marrón-rojizo o morado. Presentan yemas que se forman a la altura de las axilas de las hojas, que pueden llegar a desarrollarse y formar tallos laterales, estolones, inflorescencias y a veces tubérculos aéreos (Flores, 1993).

Las hojas se encuentran distribuidas a manera de espiral sobre el tallo, son compuestas, pecíolo con folíolos suplementarios, cuyo número y tamaño varía con la edad de la planta, segmentos en cantidad muy variable, ovalados, acuminados, vellosos, peciolados de base corniforme u oblicua; cuando jóvenes las hojas por lo común son simples y su complejidad aumenta con el tiempo, siendo a la vez menos vellosas (Sarli, 1980). Las flores son de color blanco, rosado o violáceo, según las variedades, están dispuestas en cima con largos pedúnculos, constan de cáliz de 5 lóbulos e igualmente la corola, los estambres son 5, reunidos en conos con largas anteras amarillas y ovario súpero (Sobrino *et al*, 1992). El sistema radicular es débil, superficial, fibroso y profundo. Casi todas las partes de planta pueden formar raíces, condición que es aprovechada en las técnicas de propagación rápida. Los estolones son tallos laterales, que crecen horizontalmente, por abajo del suelo y que en su extremidad forman los tubérculos (Flores, 1993); Estos tubérculos son en realidad tallos modificados, de color blanco, amarillo, violeta o rojo, de formas redondas u oblongas, regulares o irregulares, con yemas en depresiones más o menos profundas, las cuales suelen ser más numerosas hacia el ápice o corona que hacia la base del tubérculo o zona umbilical, que es donde esta la inserción de los estolones, la piel de los tubérculos pueden ser lisa, áspera o coriácea; dichos tubérculos constituyen la parte principal de almacenamiento de almidón de la planta de papa, puesto que contienen de 75 a 80 % de agua, 12 a 20 % de almidón, de 1.5 a 2 % de proteínas y de 2 a 3 % de fibras y minerales (Sobrino, 1992; Delorit, 1982 y Flores, 1993).

2.4.- Propagación.

La propagación vegetal puede llevarse a cabo de 2 maneras; de forma sexual (por semilla) y vegetativamente (de forma asexual, también llamado clonado).

- a) En la propagación sexual, las nuevas plantas, surgen de la fusión de los gametos, para desarrollar semillas, en muchos casos las semillas deberán ser fisiológicamente viables y cada una representará una nueva combinación de genes, lo que proporciona variabilidad en el fenotipo.
- b) En la propagación vegetativa (asexual) puede ser por medio de vástagos, esquejes, injertos; en esta no hay recombinación genética, lo que puede representar una ventaja ya que las plantas obtenidas son homogéneas.

Los dos tipos de propagación pueden ser impracticables en determinadas condiciones, cuando la multiplicación sexual no es satisfactoria (no se forman semillas, o se forman muy pocas o las semillas pierden rápidamente su capacidad germinativa), se suele buscar la multiplicación vegetativa. La multiplicación vegetativa *in vivo* (por esqueje, acodos, injertos), ha jugado durante muchos años un importante papel en la agricultura, pero estos métodos clásicos de la reproducción *in vivo*, o bien son insuficientes para las necesidades reales (demasiado lentos o caros), o a veces son completamente inviables, por lo que se buscan nuevas alternativas para su propagación, dentro de las cuales, el cultivo *in vitro* es una de las más aceptadas (Pierik, 1990; George, 1984).

2.5.- Micropropagación.

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas "explantes" (Hartmann *et al*, 1987; George, 1984), así pues, expresiones como biotecnología vegetal, ingeniería genética, cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos, se refiere a la obtención de plantas nuevas a partir de células, tejidos u órganos (embriones, semillas, granos de polen, tallos, meristemos apicales, hojas, raíces, frutos inmaduros), en medios nutritivos específicos y bajo condiciones asépticas (Lozoya, 1985; Torpe *et al*, 1981).

La técnica de cultivo de tejidos tiene su fundamento en la teoría de la "Totipotencialidad" postulada por Scwan y Schleiden (1938), la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa (Pierik, 1990).

Esta técnica se ha convertido en un método de reproducción que presenta diversas ventajas en comparación con los métodos tradicionales, entre estas ventajas se tienen:

- Permite reproducir grandes cantidades de plantas a partir de pocos explantes.
- Es posible propagar especies *in vitro*, que no pueden ser multiplicadas *in vivo*.
- La multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*.
- Puesto que se trata de un cultivo en condiciones asépticas, se logra la obtención de plantas libres de patógenos.
- El material reproducido puede a menudo ser almacenado bajo periodos prolongados.
- Debido a la existencia de condiciones controladas (medio nutritivo y medio físico), se puede eliminar el efecto estacional y conseguir una producción homogénea a lo largo de todo el año.
- La propagación *in vitro* implica que las plantas son cultivadas con su propio sistema radical (Pierik, 1990)

La planta de papa ha sido a menudo descrita como un cultivo modelo para el estudio del cultivo de tejidos (Dodds *et al*, 1991, citado en Bajaj, 1991).

2.5.1.- Etapas de la micropropagación.

El Profesor Murashige, define 3 pasos o etapas, en la multiplicación *in vitro* de plantas (Murashige, 1974). Esto ha sido ampliamente adoptado tanto por los investigadores y laboratorios de cultivo de tejidos comerciales, sin embargo, algunos trabajos han sugerido el tratamiento y preparación del material inicial como una etapa aparte, donde Debergh y Maene en (1981) proponen ser llamada etapa 0 (George, 1984), Hasta la fecha una cuarta etapa ha sido propuesta, por lo que en general se conocen 5 etapas en el proceso de la micropropagación.

Etapas 0 : Selección de la Planta Madre y Preparación.

Originalmente la etapa 0 fue introducida para remediar los problemas de contaminación (Debergh, 1991). Esta etapa se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *in vitro*

comience, es el pre-tratamiento correcto del material inicial, manteniendo las plantas, en la medida de lo posible, libre de enfermedades (Pierik, 1990).

Etapa 1 : Establecimiento de un cultivo aséptico.

La función de esta etapa es establecer un explante estéril en un medio de cultivo. Los factores que podrían afectar el éxito de esta etapa incluyen la elección del explante, la eliminación de contaminantes del mismo y las condiciones del cultivo, comprendiendo los factores como: luz, temperatura y la elección adecuada del soporte. Tal vez la elección del explante es el más crítico ya que éste debe de ser fisiológicamente competente para el cultivo inicial y así provocar una respuesta adecuada (Hartmann, 1987).

Etapa 2 : Multiplicación de propágulos.

El objeto de la etapa 2 es efectuar una rápida multiplicación de órganos y estructuras para poder dar origen a nuevas plantas. El material vegetal de la etapa 1 es repetidamente subcultivada en esta etapa, hasta que el número de propágulos o plantas se obtenga, sin que se pierda la estabilidad genética (Pierik, 1990; Torres, 1988)

Etapa 3 : Enraizamiento *in vitro* y Acondicionamiento.

IZT.

Como los brotes o plantas obtenidas durante la etapa 2, son muy pequeñas y aún no son capaces de soportar su crecimiento en el suelo, es preciso que algunas plantas necesiten ser especialmente tratadas en esta etapa. Así que en esta etapa se preparará a los vástagos y plantas de la etapa 2 para ser transferidas al suelo, lo que significará frenado de la formación del vástago axilares e iniciación de la elongación del vástago, continuando con la formación de raíces, ya sea *in vitro* o posteriormente *in vivo* (Pierik, 1990; George, 1984).



Etapa 4 : Transplante o transferencia a un Ambiente Natural.

En esta etapa se abarca la transferencia de las plantas de medio aséptico de cultivo al ambiente de vida natural en el invernadero y luego a su sitio final. Al principio de esta etapa, la planta puede estar enraizada o no. En cualquiera de los casos, para que puedan sobrevivir las plantas o los propágulos, deberán pasar por un periodo de **aclimatización**. Por tanto, estos se deberán volver autótrofas, desarrollarán raíces, brotes funcionales y aumentaran su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos (Hartmann y Kester, 1987).

2.5.2.- Factores que influyen en la micropropagación.

Para que la micropropagación tenga éxito se debe de tomar en cuenta diferentes factores como lo es una apropiada elección del inóculo, el establecimiento o elección del medio y el medio ambiente físico.

- a) Elección del inóculo : La elección del inóculo es un parámetro importante para lograr una exitosa propagación. Murashige (1974) menciona que diferentes factores deben ser considerados: (1) Que el inóculo debe servir como fuente de tejido, (2) la edad tanto fisiológica como ontogenética del explante, (3) la estación en la cual el explante es obtenido y (4) el tamaño del explante.
- b) Elección del medio de cultivo : La elección del medio es importante puesto que de esto dependerá que la micropropagación tenga éxito. Varios factores son fundamentales, como lo es el establecer un cultivo aséptico apropiado (si el líquido o sólido), la concentración y balance de los componentes del medio (George, 1984)
- c) Medio Ambiente Físico : Los factores físicos que influyen en la micropropagación son la luz, fotoperiodo, intensidad de luz, temperatura y humedad.

2.6.- Aclimatización.

Las plantas que se han obtenido *in vitro*, difieren en muchos aspectos de las que se originan *in vivo* (Pierik, 1990), por lo que muchas especies de plantas producidas *in vitro* deberán pasar por un proceso de aclimatización, tomando en cuenta que aclimatación y aclimatización son dos terminos diferentes: aclimatación se refiere a los procesos durante el cual las plantas se ajustan a su nuevo clima como resultado de procesos naturales, y aclimatización implica que el ser humano tendrá que interceder y guiar los procesos de ajustamiento, puesto que tendrán que apartar gradualmente a las plantas de sus condiciones *in vitro* hacia un medio ambiente externo, para su establecimiento en el invernadero o en el campo (Preece y Sutter, 1991; Debergh, 1991), puesto que las plantas cultivadas *in vitro* generalmente presentan una cutícula (capa de cera) escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa existente en el medio de cultivo. Las hojas de una planta producida *in vitro*, son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas, en consecuencia mal adaptadas a las condiciones que se pueden encontrar *in vivo*, así como también los estomas pueden no ser suficientemente operativas y la conducción de agua entre vástagos y raíces es reducida por una pobre conexión vascular (Pierik, 1990).

2.7.- Peroxidasas y Biosíntesis de lignina.

Las peroxidasas son hemoproteínas (enzimas que contienen hierro) que utilizan como donador de electrones al peróxido de hidrógeno H_2O_2 (Melo, *et al*, 1995), oxidando un amplio rango de sustancias incluyendo fenoles, citocromos, nitratos, ácido ascórbico, indoles, aminas y ciertos iones orgánicos (Gaspar, 1982).

Varias peroxidadas están localizadas en vacuolas, citosol y pared celular de la célula vegetal (Siegel, 1993) y es probablemente la enzima que aparece bajo un gran número de isoformas en varias plantas estudiadas, por ejemplo, en rábano se han encontrado 42 de ellas (Gaspar, 1982).

Por varios años se sabe que la actividad de las peroxidadas están implicadas en la regulación tanto en el crecimiento como en el desarrollo de la planta, y diferentes rutas bioquímicas han sido propuestas para explicar los mecanismos de acción de dichos procesos metabólicos (Valero, *et al*, 1991), como son los casos del catabolismo del ácido 3-indol acético (AIA), la formación de los puentes isoditrosina “extensina” (Boeuf, *et al*, 1999), en los enlaces de pectinas “ácido diferulico” por los puentes diferulico y la oxidación de alcoholes cinamilicos antes de su polimerización durante la formación de ligninas (Quiroga, *et al*, 2000; Brett, *et al*, 1990), así como la acción de defensa hacia invasiones patógenas (Gaspar, 1982).

Desde los primeros estudios las peroxidadas son clasificadas como isoenzimas acidicas y básicas, esto es de acuerdo a sus valores de PI (Quiroga, 2000); Se ha sugerido que las peroxidadas cationicas están asociadas con la degradación del AIA, y las peroxidadas aniónicas con la biosíntesis de lignina (Gaspar 1982). Las peroxidadas de la pared celular incluyen tanto isoenzimas aniónicas y catiónicas (Morales y Ros Barcelo, 1997) y están presentes tanto unidas covalentemente a la pared y solubles como enzimas apoplásticas (Polle, *et al*, 1994).

Biosíntesis de lignina

La vía de la biosíntesis de lignina y de las enzimas implicadas están muy bien conocidas.

El enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la conversión de la fenilalanina hacia el ácido *trans*-cinámico, este ácido cinámico es hidroxilado en la posición *para* por el ácido cinámico-4 hidroxilasa hacia la forma de ácido *p*-cumárico, sin embargo, el *p*-cumárico puede ser también formado por la desaminación de la tirosina catalizada por la tirosina amonia liasa. El ácido *p*-cumárico es fuertemente hidroxilado por el ácido *p*-cumárico hidroxilasa dando un ácido caffeico, por lo que el *o*-metiltransferasa, metila el ácido caffeico hacia ácido ferulico. El ácido sinapico es formado por hidroxilación y metilación del ácido ferulico; tanto el ácido cumárico, ferúlico y sinapico son convertidos a sus respectivos esterres de CoA, por el ácido cinámico-CoA-ligasa. Los esterres de los derivados del ácido cinámico son reducidos hacia sus correspondientes aldehidos y fuertemente reducido hacia alcoholes por el cinamolil-CoA-oxidoreductasa y el cinamil alcohol deshidrogenasa. Estas enzimas formarían los alcoholes cinamilicos hacia las vesículas secretoras durante la migración hacia la pared, y la polimerización debida a la peroxidasa pudiera ser durante este transporte. La policondensación de los alcoholes cinamilicos probablemente se llevan a cabo a través de la mediación de la peroxidasa de la pared, (figura 1) (Gaspar, *et al*, 1982; Brett y Waldro, 1990).

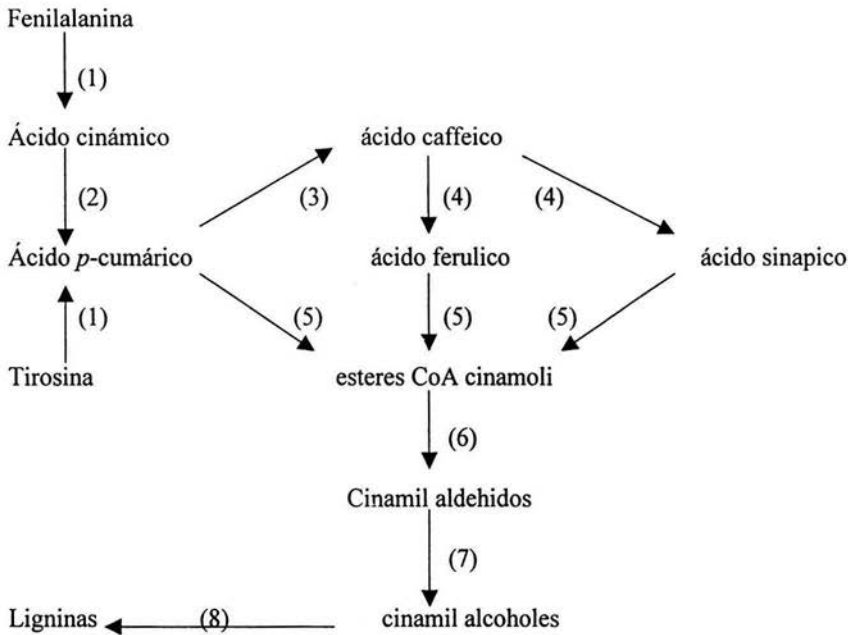


Figura 1.- Vía metabólica y enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina: (1) fenilalanina amonía ligasa, (2) ácido cinámico 4-hidroxilasa, (3) *p*-cumárico hidroxilasa, (4) *o*-metiltransferasa, (5) ácido cinámico-CoA-ligasa, (6) cinamoil-CoA-oxidoreductasa, (7) cinamil alcohol deshidrogenasa, (8) peroxidasas. (Tomado de Gaspar, 1982).

Dentro del mundo de las enzimas, las peroxidasas han sido las más extensamente estudiadas, desde los comienzos de la enzimología. Los primeros reportes sobre la actividad de peroxidasas fueron en 1855 hecho por Schonbein, quien observa que ciertos compuestos orgánicos pueden ser oxidados por soluciones diluidas de peróxido de hidrógeno en sustancias existentes tanto en plantas como en animales (Saunders, 1964, citado en Gaspar, 1982). Los estudios llevados a cabo durante el año de 1918 muestran que la actividad de las peroxidasas son encontradas generalmente en plantas (Gaspar, 1982).

En 1990 Pressey trabajando con plantas de tomate, encontró una correlación positiva entre la oxidación del ácido indolacético (IAA), y el aumento de la actividad de peroxidasas.

Por su parte, Valero, *et al* (1991) llevaron a cabo un estudio sobre las variaciones de las peroxidasas de la pared celular en epicotilos de *Cicer arietinum* durante su crecimiento; encontrando que el fraccionamiento y purificación de los extractos de proteínas extraídas de las células de los epicotilos de *Cicer arietinum*, revelarían la presencia de dos fracciones de peroxidasas (llamándolas Px-1 y Px-2), y en que la actividad específica de la Px-2 se incrementa con la edad del epicotilo, relación que no puede ser encontrada con la actividad de la Px-1.

En 1992 MacAdam, *et al.* realizaron un estudio sobre la actividad de la peroxidasas en la zona de alargamiento de la hoja del tallo de *Festuca arundinacea*, encontrando que tanto los datos cuantitativos como histoquímicas indicarían un incremento de la peroxidasa asociada a la pared, antes del cese de la elongación del tallo, esta correlación entre el incremento en la actividad de la peroxidasa y el cese de la elongación fue consistente para ambos genotipos estudiados, en donde la actividad de la peroxidasa fue relacionada con la etapa del desarrollo de la planta y conformación de la pared celular.

Caboni, *et al* (1994) en sus experimentos logran mostrar que las peroxidasas están relacionadas con el ácido indolacético IAA durante procesos de enraizamiento de algunas especies vegetales, además que la actividad de peroxidasa actúa en la oxidación, catálisis y descarboxilación del IAA en algunas especies de plantas.

Por otra parte, Ingemarsson en 1995 reporta en su investigación sobre el efecto del éter en el crecimiento celular y la actividad de peroxidasa de (*Picea abies*), que la actividad de peroxidasa unida iónicamente y covalentemente es estable durante los dos primeros días y la actividad de peroxidasas solubles presenta ciertas variaciones siendo mayores sus valores, e indicando que el efecto estimulador del etileno para la formación de la pared celular y lignificación del abeto es debido a la estimulación general tanto de la síntesis, transporte y secreción de material de la pared celular.

En (1995) Lee y Lin, llevando a cabo su estudio sobre la actividad de peroxidasa en coleoptilos y raíces de arroz (*Oryza sativa* L) creciendo en condiciones de anoxia, indican que existe una correlación recíproca entre el crecimiento y los niveles de peroxidasas unidas a pared celular en plantas de arroz etioladas.

Por otro lado, Sánchez, *et al.* (1995) En su estudio, sobre los cambios en la actividad de peroxidasa asociada a la pared celular durante el crecimiento del hipocotilo del pino, descubrieron que el ABTS y el guayacol que son sustratos se encontraron tanto en los fluidos apoplásticos, así como asociados tanto covalentemente e iónicamente a la pared celular del pino.

Lima, *et al.* (1997) llevaron a cabo un estudio sobre los cambios en el nivel de prolina, y la actividad de peroxidasa tanto del embrión y el cotiledón de *Phaseolus vulgaris* en respuesta a condiciones salinas, observando que la actividad de peroxidasa tanto del embrión y el cotiledón fue alta sin la adición del NaCl, y que el nivel de prolina del embrión disminuyó constantemente creciendo bajo condiciones salinas.

En 1998 Goncalves *et al.* obtuvieron en su estudio sobre la actividad de la peroxidasa durante la formación de raíces adventicias del cacahuate (*Castanea sativa x C. Crenata*) inducidos por dos distintos tratamientos para el enraizamiento, en dos condiciones medioambientales; observaron que la actividad de la peroxidasa sufre una disminución durante las primeras 12 horas, y seguida por un aumento que culmina en 72 horas donde se observa claramente un aumento en la actividad de la enzima.

Lima *et al.* En 1998 realizaron un estudio sobre la influencia que tiene el cloruro de sodio en el contenido de carbohidratos solubles y la actividad de peroxidases en explantes de (*Manitol esculenta*); en contrando que la actividad de peroxidasa disminuye gradualmente durante el desarrollo, e indicando que el NaCl altera el metabolismo de los carbohidratos y la actividad de peroxidasa y por lo tanto el crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro*.

Rout, *et al.* (2000) encontraron que la actividad de la peroxidasa aumenta considerablemente durante la inducción de la raíz, indicando que la peroxidasa tiene papel clave en el enraizamiento de *Psoralea corylifolia* cultivada *in vitro*.

Kadlecek *et al.* (2001) estudiaron la influencia del pretratamiento *in vitro* en la fisiología y crecimiento de plántulas de *Nicotina tabacum*, durante la aclimatización y la transferencia *ex vitro*, encontrando un elevado crecimiento en plántulas originalmente cultivadas con 3 % de scarosa en el medio de cultivo, con una alta radiación, en comparación con plántulas pretratadas sin sacarosa y con una baja radiación.

Díaz *et al* (1995) llavan a cabo un estudio donde evalúan la sobrevivencia de *Malus punila* tanto de plántulas aclimatizadas y no aclimatizadas, reportando que las plantas aclimatizadas presentan un alto porcentaje de sobrevivencia, así como una gran formación de raíces y producción de materia seca que las plantas no aclimatizadas.

2.8.- Justificación.

Para el estudio de los mecanismos que hacen posible el crecimiento y desarrollo vegetal, se planteó el siguiente trabajo el cual, y con la ayuda de la técnica del cultivo de tejidos vegetales se analiza la respuesta de la actividad de peroxidasas en plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) durante su desarrollo *in vitro* y su posible relación con la aclimatización para su establecimiento a suelo.

Teniendo en cuenta que la pared celular vegetal presenta una arquitectura compleja compuesta de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz constituida de polisacáridos y glicoproteínas, lográndose diferenciar dos tipos de paredes: la primaria y secundaria en las cuales se han detectado enzimas asociadas a dichas paredes celulares como las peroxidasas, mismas que participan en los últimos pasos de la síntesis de lignina y que ésta última juega un papel importante en la formación de la pared celular haciéndola más rígida, dándole estructura a la planta, factor que puede ser determinante para que la planta sobreviva durante el proceso de aclimatización, puesto que uno de los problemas más serios con los que se enfrenta la micropropagación *in vitro* es la escasa o pobre sobrevivencia de las plantas después de ser transferidas a suelo.

III.- Objetivos.

Objetivo general.

- Determinar la actividad de las enzimas peroxidasas en plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L) Var. Tollocan, cultivadas *in vitro* y durante su aclimatización a suelo.

Objetivos particulares.

- Propagar en condiciones *in vitro* plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L), a partir de yemas axilares.
- Evaluar la actividad peroxidasas solubles como unidas a pared en plántulas de papa cultivadas *in vitro*, en concentraciones diferentes de sacarosa.
- Evaluar la actividad peroxidasas solubles como unidas a pared tanto de raíz como del vástago de plántulas de papa durante el proceso de aclimatización.
- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de papa aclimatizadas a suelo, bajo condiciones de laboratorio.

IV.- Materiales y Métodos.

4.1.- Material Biológico.

Para la realización de esta investigación se utilizaron plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad Tollocan, previamente cultivadas *in vitro* en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales de la Unidad de Morfofisiología "UMF" de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

4.2.- Preparación del Medio de cultivo y multiplicación.

De las plántulas se aislaron fracciones con una yema vegetativa axilar (± 1 cm), las cuales se sembraron e incubaron durante 30 días en medio Murashige y Skoog (1962) (MS62), con vitaminas "Tiamina 2.7 μ M, Acido nicotínico 0.81 μ M, Piridoxina 0.5 μ M y Glicina 5.3 μ M", mio-inositol 100 mg/l y sacarosa 20 g/l, se ajustó el pH a 5.8 con 0.1N NaOH ó 0.1N HCl, Agar 7 g/l, colocando (15 ml) del medio en tubos de ensaye de 25 X 150 mm, con tapa de plástico Sigma Ware y finalmente se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión y 120°C durante 15 minutos.

4.3.- Condiciones de cultivo.

Todos los cultivos se matuvieron en un cuarto de incubación como lo propone Kozai *et al* (1997) con un fotoperiodo de 16 horas luz y una radiación de 90 - 100 μ mol/m²/s, irradiación producida por 4 lamparas fluorescentes blancas frías marca Phillips (40 w), y 8 horas de obscuridad, manteniendo una temperatura de 24 - 26 °C.

4.4.- Actividad peroxidasa en plántulas de papa cultivadas *in vitro*.

De los brotes obtenidos del paso anterior, se multiplicaron por subcultivos *in vitro*, cortando fracciones (explantos) de 1 cm de tallo con al menos una yema axilar en tubos de ensaye de 25 X 150 mm, con tapa de plástico conteniendo nuevamente un volumen de 15 ml de medio Murashige y Skoog 1962 (MS62), adicionado con el doble de la concentración original de CaCl₂ y KH₂PO₄, y con 7 g de agar, pero con distintas concentraciones de sacarosa (0g, 15g, 30g y 60g/l), el pH del medio se ajustó a 5.8 usando 0.1N NaOH ó 0.1N

HCl y se colocaron bajo las mismas condiciones de incubación que anteriormente fueron descritas; Obteniendo un total de 4 tratamientos y 30 repeticiones por tratamiento.

Con los brotes obtenidos por este método, se llevó a cabo el experimento donde se evaluó el peso fresco, la actividad de Peroxidasa tanto de proteínas solubles como unidas a pared, cada 3^{er} día durante 30 días (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30), utilizando en cada ensayo 3 plántulas por tratamiento. La determinación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976), usando albumina de suero de Bovino como estándar.

4.5.- Actividad peroxidasa y sobrevivencia de plántulas de papa, durante el periodo de aclimatización.

Se subcultivaron *in vitro* nuevamente yemas axilares de papa en medios de cultivos estériles usando como base el medio de Murashige y Skoog (1962), adicionado con el doble de CaCl₂ y KH₂PO₄ y con 7 g de agar y diferentes concentraciones de sacarosa (0g, 15g, 30g y 60g/l), el pH fue ajustado a 5.8 y se colocaron los cultivos a las mismas condiciones de incubación que el experimento anterior, obteniendo nuevamente 4 tratamientos con 30 repeticiones.

Después de 15 y 30 días de incubación *in vitro*, se extrajeron 15 plántulas de papa de cada uno de los tratamientos para su proceso de aclimatización mismos que se colocaron en recipientes individuales de unicel conteniendo tierra negra estéril. Durante su trasplante a tierra las plántulas se enjuagaron con agua destilada estéril, con el fin de eliminar el agar adherido a la planta y posteriormente se sumergieron en una solución de Benlate (MR) con el objeto de impedir la aparición de hongos; una vez colocados en los recipientes, estos se cubrieron con vasos de plásticos transparentes con el fin de dificultar la evaporación, mismos que se mantuvieron en el cuarto de incubación con las mismas condiciones de cultivo.

En este experimento se evaluó la actividad peroxidasa de proteínas solubles como unidas a pared, tanto de raíces y vástagos a los 15 y 30 días del periodo de aclimatización, utilizando en cada ensayo 3 plántulas por tratamiento. La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), usando albumina como estándar. Así como también se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas aclimatizadas durante un mes.

4.6.- Determinaciones analíticas.

Proteínas solubles y unidas a pared en forma iónica (Método de Bradford, 1976).

Se tomaron 100 mg de tejido fresco, mecerándolo con 3 ml de regulador de fosfatos 10 mM, 4 °C y pH 6.2, centrifugándolo a 10 000 g. durante 10 minutos en una microcentrifuga Eppendorf 5415C de velocidad variable. Posteriormente se recuperó el sobrenadante (proteína soluble), mismo que se utilizó para la determinación, tomando 25 µl de ésta y agregando 2.5 ml del reactivo de Bradford, este procedimiento se realizó a cada una de las muestras de los 4 tratamientos, usando albumina como estándar.

Para la determinación de proteínas unidas a pared, se resuspendió la pastilla con 3 ml del mismo regulador adicionado con NaCl 1M, agitándolo y dejándola reposar durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se recentrifugó a 14 000 r.p.m. durante 10 minutos recuperando el sobrenadante (proteína unida a pared en forma iónica), de este extracto se tomaron 25 µl y se agregaron 2.5 ml del reactivo de Bradford, la lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer lambda 2 UV/VIS a una absorbancia de 595 nm, donde los resultados fueron expresados en mg de proteína por gramo de tejido fresco.

Actividad de peroxidasa.

Se homogenizaron 100 mg de tejido fresco con 3 ml de regulador de fosfatos 10 mM, 4 °C y pH 6.2, centrifugando el extracto a 10 000 g. durante 10 minutos en una microcentrifuga Eppendorf, se recuperó el sobrenadante (proteína soluble), y el sedimento se resuspendió con 3 ml del mismo regulador adicionado con NaCl 1M, posteriormente se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente, y se recentrifugó y se recuperó nuevamente (proteína unida a pared en forma iónica).

En ambos sobrenadantes se determinó espectrofotométricamente la actividad de peroxidasa, basándose en la oxidación del guayacol (o-metilfenol) en presencia del H₂O₂, cuya reacción consistió en mezclar 50 µl de guayacol 10 mM, 50 µl de H₂O₂ 10 mM, 1.5 ml de regulador de fosfatos (pH 6.2) y 400 µl del extracto para dar un volumen total de 2 ml; la muestra fue colocada en una cubeta de cuarzo y la absorbancia fue registrada en intervalos de 2 minutos usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer lambda 2 UV/VIS, a una absorbancia de 470 nm, reportando los resultados como densidad óptica, por gramo de tejido fresco por minuto.

V.- Resultados y Discusión.

5.1.- Actividad peroxidasa en plántulas de papa cultivadas *in vitro*.

La actividad de Peroxidasas tanto solubles como unidas a pared celular sometidas a diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo 0g, 15g, 30g y 60g/l fue determinada durante un mes (Figura. 2-A, B).

La actividad de Peroxidasa soluble presentada en proteínas solubles (Figura. 2-A), presentó en general una clara actividad cíclica, es decir, que a partir del día 0, no hay una actividad considerable en los cuatro tratamientos y conforme fue transcurriendo el tiempo, la actividad fue aumentando hasta llegar a valores más altos observándose principalmente en el día 6, posteriormente ésta actividad disminuyó drásticamente hasta llegar a sus valores mínimos registrándose en el día 15, a partir de ese momento y hasta el día 31 se observó un aumento progresivo en la actividad en los 4 tratamientos. Hay que hacer notar que ésta tendencia se ve mucho más marcada para el tratamiento sin sacarosa, puesto que los valores máximos y mínimos fueron registrados para este mismo tratamiento. Una tendencia similar a dicha actividad fue encontrada por Rout *et al.* (2000), con brotes de *Psoralea corylifolia* cultivadas *in vitro*, donde la mínima actividad fue registrada entre los primeros días y la máxima actividad fue encontrada durante el sexto y octavo día. Por otro lado Sánchez *et al* (1989) reportan que los valores de la actividad de Peroxidasa soluble son bajos durante los tres primeros días y aumentan drásticamente hacia los cinco y seis días posteriores durante el crecimiento de epicotilos de *Cicer arietinum*. Así mismo Valero *et al* (1991) encuentran que la actividad específica de Peroxidasa soluble, especialmente de la fracción Px-2 en epicotilos de *Cicer arietinum* incrementa durante los primeros días del crecimiento llegando su pico más alto en el día 6. De igual manera Lima *et al* (1997) observan que la actividad de la enzima soluble tanto del embrión como del cotiledón de *Phaseolus vulgaris* presenta un proceso similar puesto que durante los primeros 3 días no se presenta actividad significativa, y no es hasta el día 6 cuando se observa la actividad más alta. Así como también, lo indican Gónkalves *et al* (1998) que la actividad de Peroxidasa en *Castanea sativa* muestra una mínima actividad después de 12 horas, culminando a las 72 horas (3 días), sin embargo una actividad enzimática se da en el día sexto, lo cual concuerda con los datos obtenidos.

Este nivel de actividad de Peroxidasa asociado en el material de la pared celular puede ser una consecuencia de la capacidad de las células de absorber proteínas solubles (Gaspar *et al* 1982; Ros Barceló *et al* 1987).

Los resultados expresados en la (figura 2-B), muestran la actividad de Peroxidasa unida a pared, que a diferencia de la actividad de Peroxidasa soluble presento un comportamiento distinto, puesto que los máximos valores solo los presentaron los tratamientos adicionados con sacarosa en el medio de cultivo, y donde dichos valores se presentaron solamente entre los 13 y los 20 días del periodo de cultivo, mostrando un rango de actividad que osciló entre 50 y 120 de D.O./gpf/min., en comparación del tratamiento sin sacarosa donde su rango de actividad osciló entre los 10 y los 50 de D.O./gpf/min., rango que se presentó durante todo el periodo de cultivo, lo que puede significar que la actividad de Peroxidasa unida a pared de cierta manera dependió de la concentración de sacarosa y no tanto del sustrato con el que se midió. Esta alta actividad de Peroxidasa unida a pared en forma iónica concuerda con los datos encontrados por Sánchez *et al.* (1995), donde observaron una alta actividad de Peroxidasa unida ionicamente en el día 16 del periodo de cultivo utilizando guayacol como sustrato en hipocotilos del pino. Esta actividad de Peroxidasa unida a pared en forma iónica se da puesto que es un grupo de enzimas de gran importancia que participan en los últimos pasos de la formación de ligninas y son responsables del ensamble entre ligninas en la formación de fenoles que inducen la rigidez de la pared celular (Lee and Lin, 1995; Sánchez *et al.*, 1995).

En cuanto al peso fresco de las plántulas cultivadas *in vitro* (figura 3), se observa en general un claro incremento de peso fresco del tejido conforme fue transcurriendo el periodo de cultivo, más no para el tratamiento 1 (0g sacarosa) puesto que su rango en el peso no fue muy amplio ya que osciló entre los 28 y 83 mg. durante todo el periodo de cultivo, diferencia que no puede ser comparada a los rangos registrados para los demás tratamientos T2 (15g), T3 (30g) y T4 (60g/l) los cuales presentaron rangos de 98 a 310 mg, 34 a 388 mg y 57 a 303 mg respectivamente, es decir que el peso fresco de dichos tratamientos fue entre 300 y 600 % mayor que el peso fresco de las plántulas cultivadas sin la adición de sacarosa en el medio.

Durante el transcurso del periodo de cultivo, se observaron algunos rasgos morfológicos distintivos entre los tratamientos, por un lado se observó la presencia de raíz que fue marcadamente menor para los tratamientos sin sacarosa y con 15 g de sacarosa, llegando a presentar plantas sin raíces (principalmente el tratamiento sin sacarosa) o con raíces muy pequeñas, a diferencia a los tratamientos adicionados con 30 y 60 g de sacarosa en el medio de cultivo, los cuales presentaron raíces más grandes y ramificadas, dichas raíces comenzaron a aparecer durante el día sexto y séptimo del periodo de cultivo.

Por otro lado en los tallos también se observaron un incremento en su grosor y ramificación presentándose principalmente en los tratamientos con mayor cantidad de sacarosa (30 y 60 g), y tallos delgados y sin ramificar para los tratamientos con menor cantidad de azúcar, de tal manera que el incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se relaciona con el aumento en el peso fresco de la plántula, en base a esto se justifica que las plantas de los tratamientos adicionados con 30 y 60 g de sacarosa muestran un elevado peso fresco por presentar tallos y raíces gruesas (Maldonado 1994).

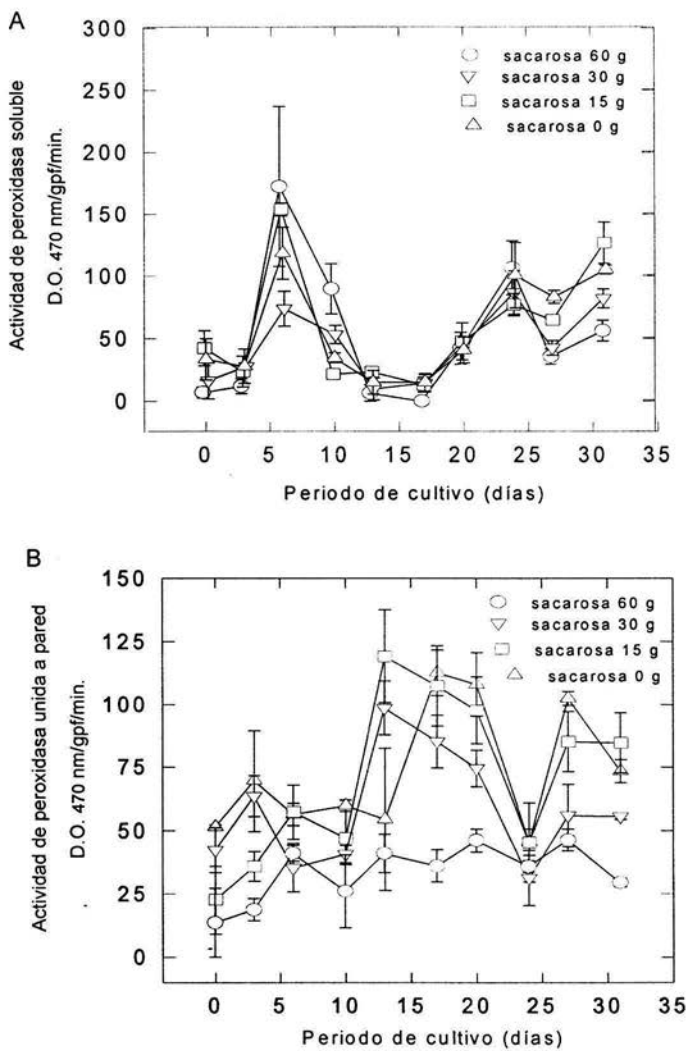


Figura 2: Actividad Peroxidasa, tanto soluble (A) como unida a pared celular (B) en plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) incubadas en medio MS62, con distintas concentraciones de sacarosa. Los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3).

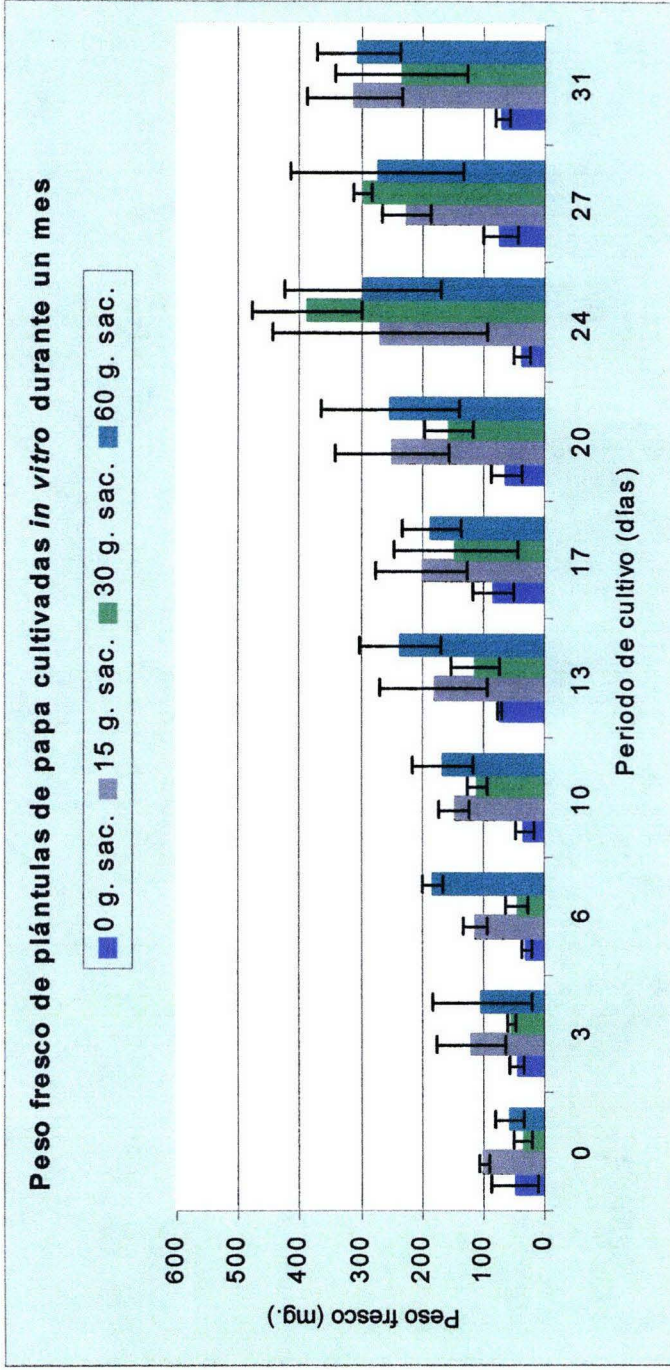


Figura 3: Peso fresco (mg) de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas *in vitro* durante un mes. Los valores muestran el promedio \pm desviación estándar (n=3).

Es claro el efecto de la concentración de la sacarosa en el medio de cultivo en función al desarrollo de la raíz, no obstante, existen reportes que demuestran que concentraciones excesivas de azúcar pueden inhibir la formación de raíz, usando con frecuencia 2 % de sacarosa en cultivos de tomate (George y Sherrington, 1984).

5.2.- Actividad peroxidasa y sobrevivencia de plántulas de papa, durante el proceso de aclimatización.

Puesto que las plantas al ser transferidas a condiciones *ex vitro*, se enfrentan con distintos factores ambientales causantes de estrés, por lo que tienen que adaptarse a las nuevas condiciones ambientales, dentro de las adaptaciones estas pueden ser tanto morfológicas como fisiológicas; por lo que en base a los resultados obtenidos del experimento anterior, se determinó la actividad de peroxidasa tanto de raíz y vástago durante el periodo de aclimatización, así como la supervivencia a su nuevo ambiente *ex vitro*.

La figura (4-A, B) muestra la actividad de peroxidasa solubles tanto de vástago y raíz de plántulas con 15 días de incubación durante el periodo de aclimatización, en la cual se observa una alta actividad por parte de las raíces de plantas sometidas a 15 días de aclimatización para los cuatro tratamientos, en comparación a la actividad manifestada en las plantas sometidas a 30 días de aclimatización. La actividad más alta de peroxidasa soluble se registró especialmente en el tratamiento 3 (adicionado con 30 g de sacarosa en el medio), tanto en plántulas sometidas a 15 y a 30 días de aclimatización (Fig. 4-B).

En cuanto a la actividad de peroxidasa soluble del vástago, se observa una relación similar presentada al de las raíces, solo que su rango de actividad para los cuatro tratamientos es menor, aunque la actividad presentada en los tratamientos 3 (30g sacarosa) y 4 (60g sacarosa) fue semejante para los vástagos con 30 días de aclimatización (Fig. 4-A); esta disminución en el rango de actividad presentada tanto de raíz y vástago se explicaría por lo que Kushad *et al* en (1999) mencionan que la actividad de peroxidasa difieren en las distintas partes de la planta del rábano, encontrándose un 49 % de la actividad total en la raíz principal y un escaso porcentaje de actividad se presenta en peciolo y hoja.

En la figura (5-A, B), se puede apreciar la actividad del enzima unida a pared tanto de vástago como de raíces de plántulas con 15 días de incubación durante el periodo de aclimatización. En la cual se observa una actividad enzimática ligeramente mayor por parte del vástago para el tratamiento 3 (30 g sacarosa), durante el inicio, a la mitad y al final del periodo de aclimatización, en contraste con los valores registrados en el tratamiento 1 (sin sacarosa en el medio), mismos que presentaron los valores más bajos durante todo el periodo de aclimatización (Fig. 5-A). Con respecto a la actividad enzimática por parte de las raíces, se observa una elevada actividad, la cual fue más evidente para el tratamiento 3 durante todo el periodo de aclimatización, en comparación a los demás tratamientos (Fig. 5-B).

Por otro lado la (figura 6-A, B) muestra la actividad de peroxidasa soluble durante el periodo de aclimatización, tanto del vástago y de la raíz, previamente incubada en un sistema *in vitro* durante 30 días, en la cual se nota una escasa actividad tanto del vástago como de la raíz en todos los tratamientos durante todo el periodo de aclimatización, en comparación a la actividad presentada por dichos órganos antes del periodo de aclimatización, es decir, sin aclimatizar. En cuanto a la actividad del enzima unida a pared mostrado en la figura (7-A y B) para vástago y raíz, se observa un ligero incremento en la actividad para los tratamientos 3 y 4 durante todo el periodo de aclimatización, con respecto a la actividad presentada por los órganos sin aclimatizar.

De manera general se aprecia una mayor actividad de peroxidasa en raíz que en vástago, especialmente para los tratamientos 3 y 4 (30 y 60 g sacarosa.) puesto que presentaron una mayor formación de raíces que en los tratamientos 1 y 2 (0 y 15g sac.); la gran cantidad de raíces podría favorecer de cierta manera la aclimatización, como lo demuestra Capellades *et al* (1991), donde manifiesta que altos niveles de sacarosa durante el cultivo *in vitro* facilita la aclimatización en plantas de rosa.

En cuanto al peso fresco del vástago y la raíz presentado durante el periodo de aclimatización, se observa de manera importante un aumento de este tanto del vástago y raíz de plántulas pretratadas con 60 g de sacarosa en el medio de cultivo, sin importar el tiempo de incubación utilizado *in vitro*. Tendencia principalmente observada en las raíces (Tabla 1,2). Por lo que se aprecia una dependencia mayor del crecimiento en función de la concentración de sacarosa, como lo demuestra Kerbauy (1993) donde encuentra una correlación entre el nivel de sacarosa y la longitud de la raíz, el cual una mayor cantidad de sacarosa (no mayor 40 g/l) promueve un incremento en la elongación de la raíz en comparación con las raíces tratadas en ausencia de sacarosa y así como con 5 g/l y 10 g/l del azúcar, el cual retarda el crecimiento de la raíz en plántulas de *Oncidium varicosum*.

Por otro lado, el porcentaje de supervivencia, tanto de plántulas tratadas con 30 g/l y 60 g/l de sacarosa presentaron un 100 % de supervivencia durante todo el periodo de aclimatización, (Fig. 8,A-B), resultados similares fueron reportados por Van Huylenbroeck y Debergh (1996) utilizando plántulas de *Spathiphyllum* los cuales fueron tratadas con 3 y 6% de sacarosa, mismas que mostraron un 100 % de supervivencia en ambos tratamientos durante su aclimatización *ex vitro*.

En cuanto a las plántulas tratadas sin sacarosa y con 15 g/l de sacarosa en el medio de cultivo, su porcentaje de supervivencia durante su aclimatización se vio afectado presumiblemente por la escasa o nula cantidad de raíces que presentaron, puesto que un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga muy difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración (Pierik 1990).

Durante el periodo de aclimatización se observó una mayor actividad enzimática en extractos unidos a pared celular que en la fracción soluble. Esta elevada actividad de peroxidasa unida a pared celular fue más evidente principalmente tanto en vástagos como en raíces de plántulas que fueron anteriormente pretratadas con 3 y 6 % de sacarosa en el medio de cultivo e incubadas *in vitro* durante 15 días, en comparación a la actividad registrada de los órganos de plántulas incubadas *in vitro* durante 30 días bajo las mismas concentraciones de sacarosa, donde la actividad enzimática fue ligeramente menor, sin embargo, en ambos casos su porcentaje de sobrevivencia durante todo el periodo de aclimatización fue del 100 %.

Tomando en cuenta que la actividad de peroxidasa unida en forma iónica a la pared celular es aceptada como representante de la actividad de dicha pared relacionandose específicamente con la detención de la expansión o elongación celular necesaria para la adquisición de una morfología normal (Gaspar, *et al*, 1982; Ortiz, 2000), dándole estructura y rigidez a la planta, lo cual se ve reflejado en la sobrevivencia a condiciones *ex vitro*, lo cual indicaría que existe una correlación positiva entre la actividad de peroxidasa unida a pared celular y la sobrevivencia de plántulas transplantadas a suelo.

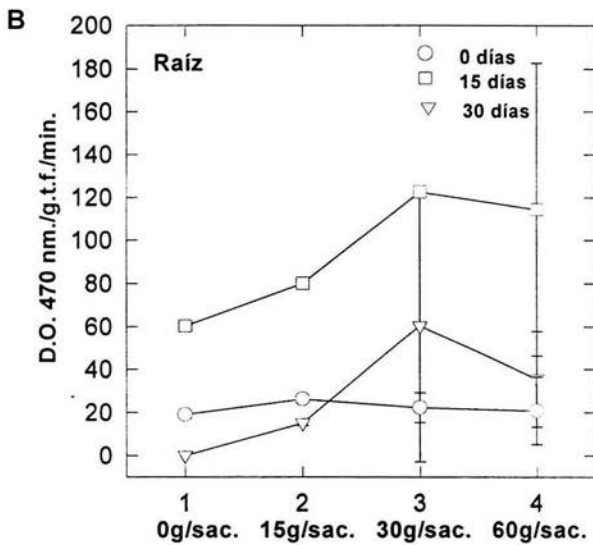
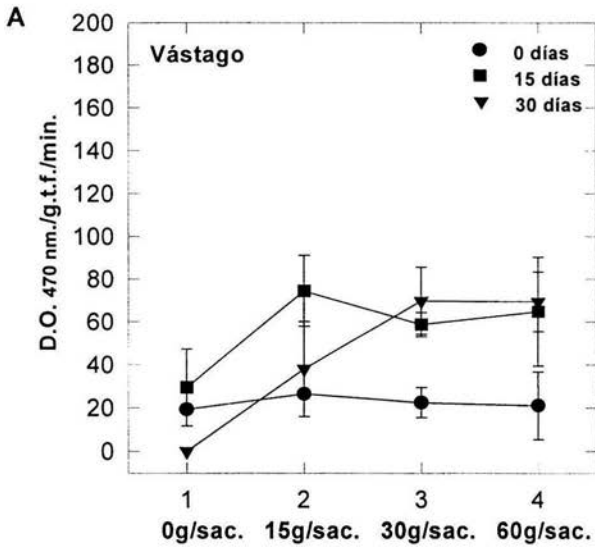


Figura 4: Actividad de Peroxidasa soluble de Vástago (A), y Raíz (B) durante el periodo de aclimatización (con 0, 15 y 30 días de aclimatización), de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*), en función de la concentración de sacarosa durante 15 días de incubación *in vitro*. los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3).

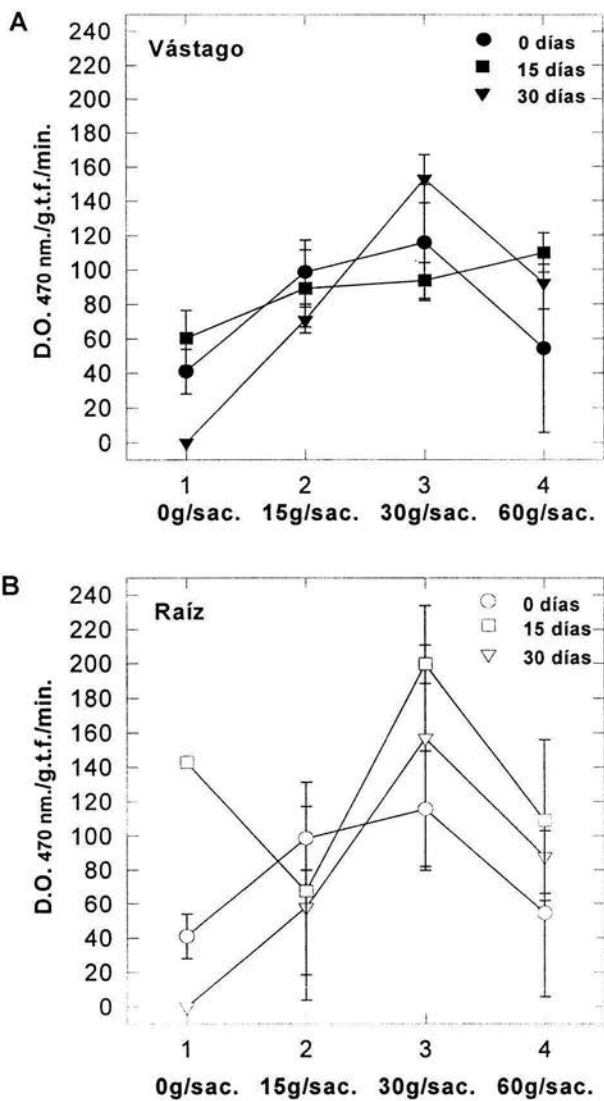
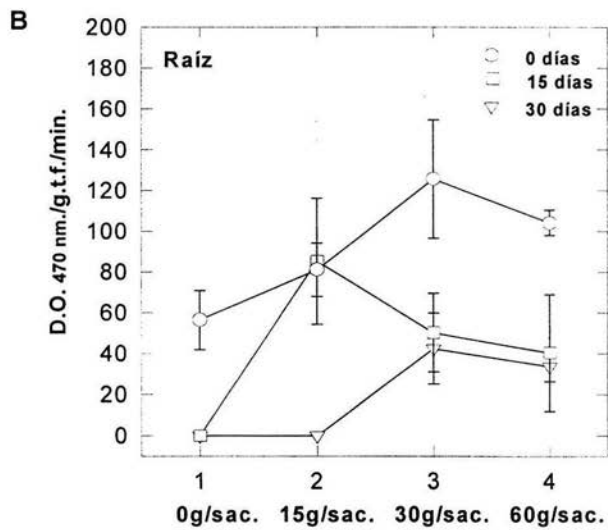
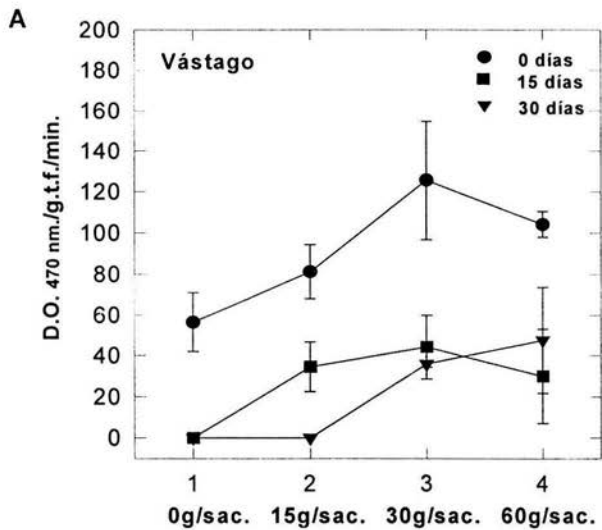


Figura 5: Actividad de Peroxidasa unida a pared celular de Vástago (A), y Raíz (B) durante el periodo de aclimatización (con 0, 15 y 30 días de aclimatización), de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*), en función de la concentración de sacarosa durante 15 días de incubación *in vitro*. los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3).



IZT.

Figura 6: Actividad de Peroxidasa soluble de Vástago (A), y Raíz (B) durante el periodo de aclimatización (con 0, 15 y 30 días de aclimatización), de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*), en función de la concentración de sacarosa durante 30 días de incubación *in vitro*. los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3).

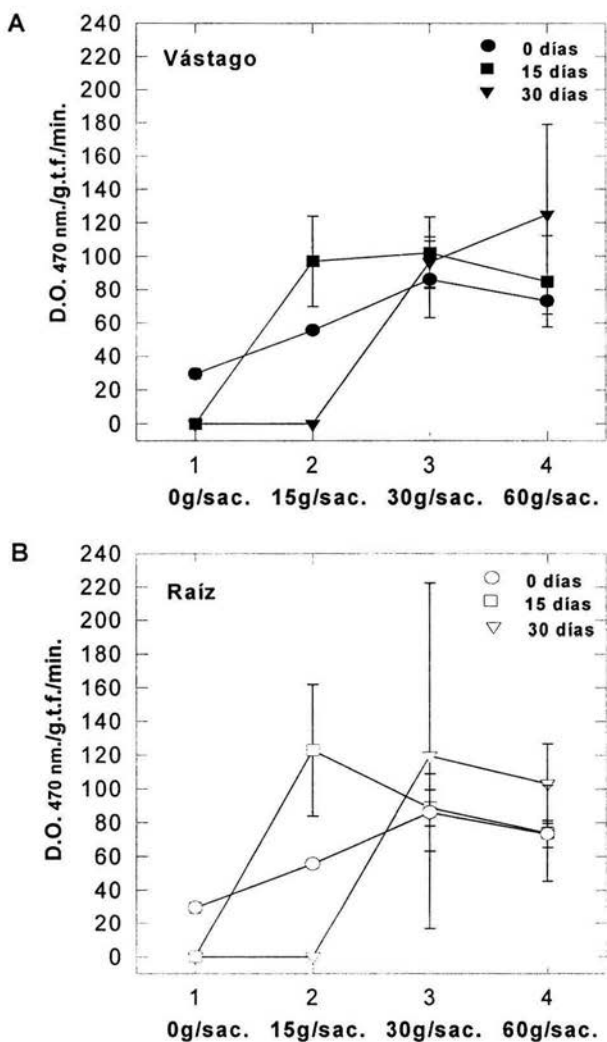


Figura 7: Actividad de Peroxidasa unida a pared celular de Vástago (A), y Raíz (B) durante el periodo de aclimatización (con 0 , 15 y 30 días de aclimatización), de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*), en función de la concentración de sacarosa durante 30 días de incubación *in vitro*. los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3).

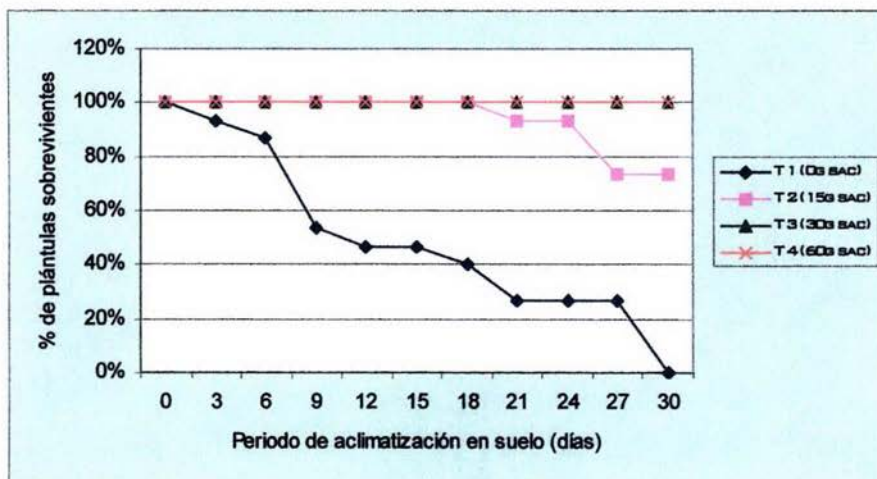
Tabla 1 : Peso fresco (mg) de vástago y raíz de plántulas de (*Solanum tuberosum*) aclimatizadas 15 días en función a la concentración de sacarosa usada durante 15 y 30 días de cultivo *in vitro*. Los valores muestran el promedio \pm desviación estándar (n=3).

Organo		15 días de incubación			
		0 g sacarosa	15 g sacarosa	30 g sacarosa	60 g sacarosa
Vástago		21.6 \pm 2.9	128.3 \pm 43.7	96.6 \pm 41.6	135 \pm 34.6
Raíz		0	10 \pm 0	12.5 \pm 3.5	50 \pm 27.8
		30 días de incubación			
Vástago		0	128.3 \pm 23.1	115 \pm 57.6	163.3 \pm 66.6
Raíz		0	26.6 \pm 11.5	48.3 \pm 20.2	76.6 \pm 29.3

Tabla 2: Peso fresco (mg) de vástago y raíz de plántulas de (*Solanum tuberosum*) aclimatizadas 30 días en función a la concentración de sacarosa usada durante 15 y 30 días de cultivo *in vitro*. Los valores muestran el promedio \pm desviación estándar (n=3).

Organo		15 días de incubación			
		0 g sacarosa	15 g sacarosa	30 g sacarosa	60 g sacarosa
Vástago		0	141.6 \pm 65.2	130 \pm 18	216.6 \pm 28.8
Raíz		0	45 \pm 0	83.3 \pm 40.1	135 \pm 39
		30 días de incubación			
Vástago		0	0	266.6 \pm 11.5	268.3 \pm 59.6
Raíz		0	0	126.6 \pm 40.4	76.6 \pm 2.8

A Plántulas con 15 días de incubación *in vitro*.



B Plántulas con 30 días de incubación *in vitro*.

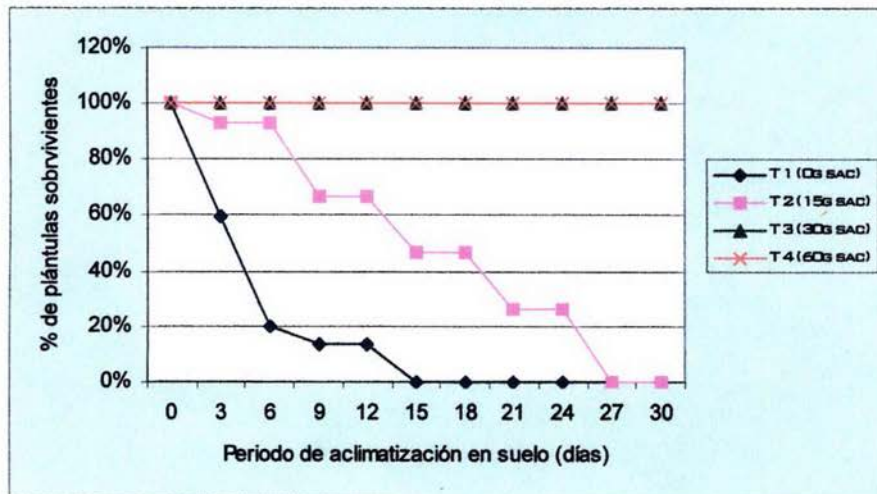


Figura 8: Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de papa durante el proceso de aclimatización a suelo, después de 15 (A) y de 30 (B) días de incubación *in vitro*.

VI.- Conclusiones.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- La mayor actividad de peroxidasa unida a pared celular de plántulas cultivadas *in vitro*, se presentó para los tratamientos adicionados con 30 y 60 g/l de sacarosa en el medio de cultivo; por lo que dicha actividad dependió fuertemente de la concentración de sacarosa.
- La concentración de sacarosa del 3 y 6% (w/v) en el medio de cultivo, influyó positivamente sobre la presencia de distintos órganos, principalmente en la formación de raíz durante el cultivo *in vitro*.
- Durante el proceso de aclimatización, la mayor actividad de peroxidasa unida a pared celular fue mucho más evidente principalmente en las raíces que en vástagos de plántulas pretratadas con 30 y 60 g/l de sacarosa y con un periodo de incubación de 15 días.
- Las plántulas pretratadas con 30 y 60 g/l de sacarosa en el medio de cultivo presentaron un porcentaje de sobrevivencia del 100 % durante todo el proceso de aclimatización.
- El peso fresco del tejido *in vitro* observó un incremento al elevar la concentración de sacarosa al 3 y 6 % (w/v), en el medio de cultivo, el cual persistió aún durante el periodo de aclimatización.
- Se encontró una correlación entre la actividad de peroxidasa unida a pared en plántulas pretratadas con 3 y 6 % de sacarosa en el medio e incubadas 15 días *in vitro* con la aclimatización, la cual mejora la sobrevivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*.

VII.- Sugerencias.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación se logró visualizar una imagen superficial de cómo actúan las Peroxidasas en las plántulas de papa durante el cultivo *in vitro* así como en su proceso de aclimatización a suelo, por lo que se sugiere la realización de algunas mediciones extras, sobre todo en plántulas aclimatizadas a suelo, como lo es evaluar el contenido de lignina, así como también medir la actividad fotosintética en base a la fluorescencia de la clorofila, esto con el fin de conocer el comportamiento que va adquiriendo las plántulas en su ambiente *ex vitro*.

VII.- Bibliografía

- Boeuf G., B. Legrand y S. Rambour. 1999. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidases isoenzymes in chicory root explants. *Physiologia Plantarum*. **106**: 331-336.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Brett C. y K. Waldro. 1990. Physiology and Biochemistry of plant cell wall. Press. London.
- Caboni E., C. Damiano, y S. Tonarini. 1994. Effect of phenols on peroxidase activity and *in vitro* rooting of "M9 Jork". *Adv. Hortscience*. **8**: 49-51.
- Capellades, M.Q., R. Lemeur y P. C. Debergh. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culturae*. **25**: 21 – 26.
- Debergh P.C. 1991 Acclimatization techniques of plant from *in vitro*. *Acta Horticulturae*. **289**: 291-300.
- Debergh P.C. y P.E. Read. 1991. Micropropagation. En: Debergh P.C. and R.H. Zimmerman (Eds) Micropropagation, Technology and application. Kluwer Academic. Pub. Netherlands.
- Delorit R., H. Ahlgren. 1982. Producción agrícola. Edit Compañía Editorial Continental. Méx. 783 p.
- Díaz P.J.C., E.G. Sutter, y K.A. Shackel. 1995. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum* **95**: 225 - 232.

- Dodds J.H., D. Silva-Rodriguez, P. Tovar. 1991. Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) En: Bajaj Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry (Vol. 19) High-Tech and Micropropagation III. Springer-Verlag Berlin. 91-106.
- Flores T.J. 1993. Efecto de tres salicilatos en el desarrollo de plantas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro*. Tesis licenciatura ENEP-Iztacala. UNAM. Méx. 119 p.
- Gaspar T., C. Penel, T. Torpe y H. Greppin. 1982. Peroxidasas 1970-1980 (Asuvery of their biochemical and physiological roles in hirher plants). Univ. Geneva, Geneva. 21-44.
- George E. y P. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited Press, London.
- Goncalves J.C., G. Diogo y S. Amancio. 1998. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* X *C. crenata*) Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*. 72: 265-275.
- Hartmann H.T. y, D.E. Kester. 1987. Propagación de plantas (principios y prácticas) Edit. Continental. Méx. 639 – 665 p.
- Helligren J. y P. Li. 1987. Freezer preservation of suspension cultures of potato. En: Bajaj Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. (Vol. 3) The potato. Springer, Verlag, Berlin. 466-471 pp.
- Hill F.A. 1965. Botánica económica, plantas útiles y productos vegetales.
- Ingemarsson B. 1995. Ethylene effects on peroxidases and cell growth patterns in *Picea abies* hypocotyls cuttings. *Physiologia Plantarum*. 94: 211-218.
- Kadlec P., I. Ticha, D. Haisel, V. Capkova y C. Schefer. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: (4) 695-701.
- Kerbauy B. G. 1993. The effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-like dobies in recalcitrant root tip meristems of *Ocidium varicosum* (Orchidaceae). *Lindleyana* 8 (3): 149–154.

- Kozai T., K. Chieri y B. R. Jeong. 1997. Environmental control for the large production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tissue and Organ Culturae*. **51**: 49–56.
- Kushab M. M., M. Guidera y B. Anthony. 1999. Distribution of horseradish peroxidase activity in horseradish plant. *Science*. **34** (1): 127–129.
- Langer R.H. y G.D. Hill. 1991. Agricultural plants. 2ª edición Cambridge University Press. 320–324 p.
- Lee, Tse-Min y Lin Yaw-Huei. 1995. Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and root. *Plant Science*. **106**: 1-7.
- Lima G., A. Fernández y A. Cataneo. 1998. Alteracoes na actividade da preoxidase e do conteúdo de carbohidratos em mandioca cultivada *in vitro* sob estresse salina. *Scientia Agrícola*. **55**: (3).
- Lima G., C. Rossi y D. Hakuort. 1997. Actividade de peroxidases (EC.1.11.1.7) e teor de prolina no embriao e cotiledones de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. Cultivado em condicoes de salinidade. *Scientia Agrícola*. **54**: (3).
- Lozoya S.H. 1985. Micropropagación vegetal. *Ciencia y Desarrollo*. **65**: 63-70.
- MacAdam J.W., C.J. Nelson y R.E. Sharp. 1992. Peroxidase in the leaf elongation zone of tall fescue I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotype differing in lengt of elongation zone. *Plant Physiology*. **99**: 872-878.
- ➤ Maldonado U. 1982. Papa alimento base del pueblo mexicano. Universidad de Chapingo, Méx. 9 p.
- Maldonado V.M.A. 1994. Efecto del medio de cultivo *in vitro* sobre el potencial osmótico y la síntesis de prolina de papa (*Solanum sp.* L). Tesis licenciatura ENEP-Iztacala. UNAM. Méx. 62 p.

- Melo N., J. Cabral, y P. Fevereiro. 1995. Extracelular preoxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. Purification and characterization of two cationic enzymes. *Plant Science*. **106**: 177-184.

- Morales M. y, A. Ros Barceló. 1997. A basic preoxidase isoenzyme from vacuoles and cell wall of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*. **45**: 229-232.

- Murashige T. 1974. Plant propagation throught tissue cultures. *Annual Review Plant Physiology*. **25**: 135-166.

- Murashige T. 1974. Propagation through tissue cultures. *HortScience*. **9**: 2-3.

- Murashige T. y F.S. Koog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**: 473-497.

- Ortiz M.J.G. 1986. Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum spp*). Tesis licenciatura ENEP-Iztacala. UNAM. Méx. 56 p.

- Ortiz M.J.G. 2000. Respuestas fisiológicas y bioquímicas de papa (*Solanum sp*) var. Tollocan bajo diferentes condiciones de cultivo *in vitro*. Tesis de M. en C. ENCB-IPN Méx. 75 p.

- Pierik R.L.M. 1990. Cultivo de las plantas superiores. Mundi-Prensa, España. 181 p.

- Pollet A., T. Otter, y F. Seifer. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*. **106**: 53-60.

- Preece J.E. y E.G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh P.C. and R.H. Zimmermam (Eds) Micropropagation, Technology and application. Kluwer Academic. Pub. Netherlands.

- Pressey R. 1990. Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiology*. **93**: 798-804.

- Primo G.L. 1996. Acción de la pro-vitamina D₂, en el cultivo *in vitro* de la papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Tollocan. Tesis licenciatura ENEP-Iztacala. UNAM. Méx. 51 p.
- Quiroga M., C. Guerrero, M.A. Botella, A. Barceló, I. Anaya, F. Medina, S. De Forchetti, H. Tigier y V. Valpuesta. 2000. A tomato preoxidase involved in the síntesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*. **122**: 1119-1128.
- Ros Barceló A., R. Muños y F. Sabater. 1987. Lupin preoxidases I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiologia Plantarum*. **71**: 448-454.
- Rout G.R., S. Samantaray y P. Das. 2000. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* lin: Peroxidase activity as a marker. *Plant Growth Regulation*. **30**: 215-219.
- Saad V. M. L. 1994. Inducción de embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis licenciatura ENEP-Iztacala. UNAM. Méx. 89 p.
- Sánchez M., G. Revilla y I. Zarra. 1995 Changes in preoxidase activity associated with cell wall during Pine hypocotyl growth. *Annals of Botany*. **75**: 415-419.
- Sarli E.A. 1980. Tratado de horticultura. Editorial, Hemisferio Sur. Argentina. 459 p.
- Saunders B.C., A.G. Holmes-Siedle y B.P. Stark. 1964. Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. En: Gaspar T., C. Penel, T. Torpe y H. Greppin. 1982. Peroxidases 1970 - 1980 (Asuvery of their biochemical and physiological roles in hirher plants). Univ. Geneva; Geneva. 21 - 44.
- Siegel B.Z. 1993. Plant preoxidases an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*. **12**: 303-312.
- Sobrino E.I.y V.E. Sobrino. 1992. Hortalizas de legumbre-tallo-bulbo y tuberosas. Edit. AEDOS. Barcelona, España 333 p.
- Thorpe T.A.y S. Biondi. 1981. Regulation of plant organogenesis. Academia Press. 213-239.

- Torres K.C. 1988. Tissue culture techniques for horticultural crops "An AVI book". New York.
- Valero P., G. Nicolas y E. Labrador. 1991. Variations of cell wall preoxidases in epicotyls of *Cicer arietinum* during growth. *Plant Science*. **74**: 171-178.
- Van Huylbroeck J.M. y P.C. Debergh. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiologia Plantarum*. **96**: 298-304.
- Van Huystee R.B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*. **38**: 205-219.