

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO INDUCTOR DE TUBERIZACIÓN

in vitro EN PLANTAS DE PAPA

Silvia Sánchez Rojo y Humberto Antonio López Delgado

RESUMEN

El tubérculo de papa es el órgano más utilizado para el cultivo de esta especie. La microtuberización proporciona ventajas en el almacenamiento y transporte de germoplasma libre de patógenos. Los microtubérculos pueden plantarse directamente en el suelo y presentan las mismas características bioquímicas y morfológicas que los producidos en el campo. Para probar el efecto inductor de tuberización del H_2O_2 se incubaron explantes nodales en 1, 5 y 50mM, posteriormente se cultivaron en me-

dio MS modificado en oscuridad a dos temperaturas (8 y 20°C), por 60 días. El H_2O_2 en 1 y 5mM promovió la supervivencia, inhibió el crecimiento, indujo la microtuberización e incrementó el peso y tamaño de microtubérculos. Este trabajo demuestra un efecto fisiológico del H_2O_2 a largo plazo en la inducción de tuberización *in vitro*, tolerancia a baja temperatura, y propone una técnica para incrementar la producción de microtubérculos en menor tiempo y a bajo costo.

HYDROGEN PEROXIDE AS AN *in vitro* TUBERIZATION INDUCER IN POTATO PLANTS

Silvia Sánchez Rojo and Humberto Antonio López Delgado

SUMMARY

The potato tuber is the organ commonly used for the cultivation of this species. Micro-tuberization provides advantages for the storage and transport of pathogen free germplasm. Micro-tubers can be planted directly in soil and have the same biochemical and morphological characteristics as those produced in the field. To investigate the effect of H_2O_2 as a tuberization inducer, nodal explants from micro-plants were incubated in 1, 5 and 50mM solutions and cultured in a modified MS medium, under

darkness at two temperatures (8 and 20°C) for 60 days. H_2O_2 at 1 and 5mM enhanced survival, inhibited growth, induced micro-tuberization and augmented the weight and size of micro-tubers. This paper reports a long term physiological effect of H_2O_2 in the induction of *in vitro* tuberization, tolerance to low temperature, and proposes a new technique for increasing micro-tuber production in less time and at low cost.

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes. Ocupa el cuarto lugar en la producción anual, después del arroz (*Oryza sativa*), el trigo (*Triticum aestivum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*). Es un alimento de gran importancia por su valor alimenticio, rico en hidratos de carbono, proteínas, minerales (particularmente K y Ca) y vitaminas (Fernie y Willmitzer, 2001). En la industria se le utiliza principalmente en la

producción de hojuelas o papas fritas. Sin embargo, esta especie es susceptible a estrés biótico y abiótico, tal como temperaturas extremas, el ataque de *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío, y el síndrome de punta morada asociado a fitoplasma (Mountain Valley, 2003; Rubio *et al.*, 2000).

Los programas de producción de tubérculo-semilla utilizan la microtuberización (desarrollo de tubérculos *in vitro*) como una alternativa en proyectos de investigación o producción, ya que en con-

diciones asépticas reduce el riesgo de ataque por patógenos, pérdida de germoplasma, y facilita el transporte por su reducido tamaño (CIP, 1988). Esta técnica consiste en inducir la diferenciación del brote axilar de explantes nodales de vástago en un tubérculo, cuando se cultivan en un medio inductor, con inhibidores del crecimiento, citocininas y alto contenido de sacarosa, y se incuban en oscuridad (López-Delgado y Scott, 1997; Jackson, 1999; Veramendi *et al.*, 1999). La formación del tubérculo involucra al menos

dos procesos distintos: la inhibición del crecimiento axial y una expansión radial del órgano que tuberiza (García-Torres y Gómez-Campo, 1973).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es considerado una molécula señal y un regulador de la expresión de algunos genes en las células. Cuando se acumula en las plantas, activa factores de transcripción que regulan diferentes procesos fisiológicos, inhibe el crecimiento y desarrollo vegetal, y estimula los mecanismos de defensa a estrés biótico y abiótico

PALABRAS CLAVE / Microtuberización / Peróxido de Hidrógeno / *Solanum tuberosum* L. /

Recibido: 17/03/2009. Modificado: 17/02/2010. Aceptado: 18/02/2010.

Silvia Sánchez-Rojo. Biólogo, Universidad Autónoma del Estado de México. Estudiante de Maestría, Colegio de Postgraduados (COLPOS), Montecillo, México. Instituto Nacional

de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México.

Humberto Antonio López-Delgado. Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México. M.C., COLPOS, México. Ph.D., University of Wales, RU. Investigador, INIFAP, México. Direc-

ción: Laboratorio de Fisiología-Biotecnología. Programa Nacional de Papa, INIFAP, Conjunto SEDAGRO. 52142, Metepec, Edo. de México. e-mail: lopez.humberto@inifap.gob.mx

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO INDUTOR DE TUBERIZACIÓN *in vitro* EM PLANTAS DE BATATA

Silvia Sánchez Rojo e Humberto Antonio López Delgado

RESUMO

O tubérculo de batata é o órgão mais utilizado para o cultivo desta espécie. A microtuberização proporciona vantagens no armazenamento e transporte de germoplasma livre de patógenos. Os microtubérculos podem ser plantados diretamente no solo e apresentar as mesmas características bioquímicas e morfológicas que os produzidos em campo. Para provar o efeito indutor de tuberização do H₂O₂, foram incubados explantes nodais em 1, 5 e 50mM, posteriormente foram cultivados em meio MS mo-

dificado na escuridão a duas temperaturas (8 e 20°C), por 60 dias. O H₂O₂ em 1 e 5mM promoveu a sobrevivência, inibiu o crescimento, induziu a microtuberização e incrementou o peso e tamanho de microtubérculos. Este trabalho demonstra um efeito fisiológico do H₂O₂ de longo prazo na indução de tuberização *in vitro*, tolerância a baixa temperatura, e propõe uma técnica para incrementar a produção de microtubérculos em menor tempo e a baixo custo.

(Yu *et al.*, 2002, 2003; Pnueli *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2005). Por las características de este compuesto (altamente reactivo, vida media corta y potente oxidoreductor de componentes celulares) existen pocos trabajos donde se experimenta su aplicación exógena en plantas. Ensayos previos en la misma especie revelaron que aspersiones con H₂O₂ (0,1-50mM) inhibieron el crecimiento del vástago y aumentaron el contenido de almidón y lignina en tubérculos, sin presentar síntomas tóxicos (Foyer *et al.*, 1997; López-Delgado *et al.*, 1998a, b, 2005). En plantas positivas a fitoplasma se demostró el potencial del H₂O₂ para aumentar el rendimiento y calidad de los tubérculos (no destinados para semilla) mediante el incremento en el peso, contenido de almidón y porcentaje de brotación de tubérculos (Romero-Romero y López Delgado, 2009). En el presente trabajo se evaluó el potencial del H₂O₂ como inductor de la formación de microtubérculos, resistencia en baja temperatura y porcentaje de supervivencia.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Los experimentos se realizaron con microplantas de *Solanum tuberosum* L. de la variedad Atlantic, procedentes del banco de germoplasma del laboratorio de Fisiología-Biotecnología del Programa Nacional de Papa, INIFAP (Instituto Nacional de Investi-

gaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), ubicado en Metepec, estado de México.

Incubación de explantes nodales en H₂O₂

Se seccionaron microplantas de 28-30 días de desarrollo en explantes nodales. Se incubaron 40 de éstos en cajas de Petri con soluciones de H₂O₂ (0, 1, 5 y 50mM) pH 5,7 por 60min, de acuerdo con trabajos previos (Foyer *et al.*, 1997; López-Delgado *et al.*, 1998a, b, 2005). Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Inducción de tuberización

Después de la incubación los explantes nodales fueron colocados en tubos de cultivo con 8ml de medio Murashige y Skoog (1962) modificado a pH 5,7 con 8% de sacarosa y 0,5mg·l⁻¹ de bencil amino-purina (BAP). Las condiciones de cultivo fueron: 16h de fotoperíodo usando luz fluorescente (400-700nm, 35µmol·m⁻²·s⁻¹) a nivel de la planta y temperatura de 20 ±1°C. Para evaluar el efecto del H₂O₂ sobre la viabilidad y el crecimiento se registró el porcentaje de supervivencia y la longitud de microplanta 15 días después de la incubación. Al término de este periodo, todos los explantes de cada tratamiento se mantuvieron durante 60 días en oscuridad, 20 de ellos a 20°C y los 20 restantes a 8°C. Cada diez días se registró el porcentaje de tuberización y al final del periodo se registró el peso

y número de tubérculos por planta.

Diseño y análisis estadísticos

Se utilizó un arreglo factorial 4×2, con un diseño completamente aleatorio y se analizaron los resultados del promedio de tres experimentos mediante ANOVA para el porcentaje de supervivencia y tuberización, longitud de microplanta, peso y número de tubérculos por planta; y prueba de Tukey (95%) para determinar los tratamientos con diferencias significativas.

Resultados y Discusión

El presente trabajo muestra evidencia del efecto de incubación durante 1h en H₂O₂ sobre la supervivencia de explantes, inhibición del crecimiento y la inducción de tuberización en dos condiciones de temperatura.

Viabilidad de los explantes incubados

Durante la manipulación de microplantas para subcultivo, éstas se someten a diferentes tipos de estrés (mecánico, hídrico, de temperatura, etc.), reduciéndose el porcentaje de viabilidad de los explantes subcultivados. En este caso se produjo un estrés adicional por la incubación de los

explantes durante 1h en las diferentes soluciones (condiciones conocidas como estrés por inundación que pueden ser desfavorables para la supervivencia de los mismos). El H₂O₂ promovió la supervivencia de explantes nodales en las concentraciones 1 y

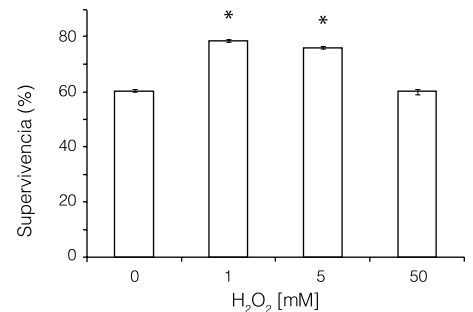


Figura 1. Porcentaje de supervivencia de explantes nodales de 15 días de cultivo en medio de tuberización e incubados previamente en H₂O₂ durante 1h.

*Significativo con respecto al testigo. Tukey, p<0,005; n=20.

5mM, en 18,29 y 15,59%, respectivamente (Figura 1). López-Delgado *et al.* (1998a) reportaron que la incubación previa de explantes nodales en altas concentraciones de H₂O₂ (5-50mM) en papa incrementaron la termotolerancia. Foyer *et al.* (1997) y Willekens *et al.* (1995) sugirieron que la tolerancia a estrés abiótico en plantas se relaciona con el incremento limitado de los niveles de H₂O₂.

Inhibición del crecimiento

La longitud del brote desarrollado a partir de explantes nodales incubados fue signi-

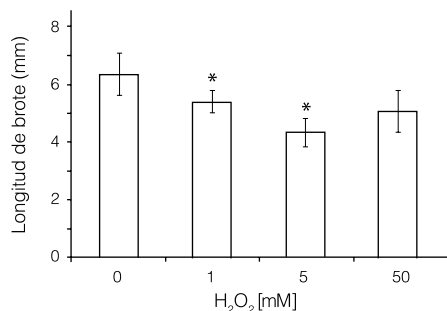


Figura 2. Longitud de microplantas de 15 días de cultivo *in vitro*, previa incubación de explantes nodales en H₂O₂ durante 1h. *Significativo con respecto al testigo. Tukey, p<0,005; n=20.

ficativamente menor en los tratamientos con 1 y 5mM H₂O₂ (15,03 y 31,64%, respectivamente; Figura 2). En ensayos similares de López-Delgado *et al.* (1998b), el H₂O₂ retardó el crecimiento del vástago en microplantas provenientes de explantes nodales preincubados en dicho compuesto, sin presentar síntomas de toxicidad. Pnueli *et al.* (2003) demostraron que la acumulación de H₂O₂ en plantas de *Arabidopsis sp.* inhibió el crecimiento y desarrollo vegetal; estos autores sugieren que el incremento de H₂O₂ intracelular activa la expresión de factores de transcripción involucrados en el control del crecimiento.

Inducción de tuberización

En condiciones de baja temperatura (8°C) los tratamientos con H₂O₂ incrementaron significativamente el porcentaje de explantes tuberizados a partir de los treinta días de inducción en 1,19 (1mM); 1,31 (5mM) y 2,1 (50mM) veces con respecto al testigo. Las diferencias más notables se registraron a los 40 días, cuando el porcentaje de tuberización en los tratamientos con 1 y 50mM fueron significativamente mayores (1,48 y 1,52 veces) que el testigo (Figura 3). Schopfer (1996) propuso que la rigidez de la pared celular, y por lo tanto la inhibición del crecimiento, es mediada por niveles de H₂O₂. Es posible que el

H₂O₂ reguló el crecimiento celular durante la inducción de microtubérculos, ya que este proceso involucra la inhibición del crecimiento axial del órgano que tuberiza (García-Torres y Gómez-Campo, 1973).

A temperatura ambiente (20°C) entre los primeros 10 y 20 días de inducción, los explantes nodales incubados en 5mM de H₂O₂ presentaron porcentajes de tuberización significativamente mayores, de 2,45 (10 días) y 1,45 (20 días) veces respecto al testigo. A los 50 días, 1mM de H₂O₂ indujo significativamente 1,06 veces más explantes tuberizados que el testigo (Figura 4). Se observó un mayor efecto inductor del H₂O₂ en bajas concentraciones a 20°C (1 y 5mM) a lo largo del periodo de cultivo (Figura 4). Cabe señalar que a 1mM hubo efecto significativo en la inducción de microtubérculos independientemente de las

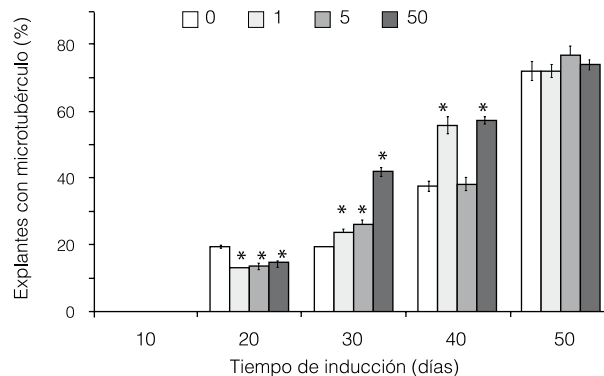


Figura 3. Porcentaje de explantes con tubérculo previamente incubados en H₂O₂ 0, 1, 5 y 50mM durante 1h y transferidos a cultivo *in vitro*. El periodo de inducción fue de 50 días a 8°C en oscuridad. *Significativo con respecto al testigo. Tukey, p<0,005; n=20.

condiciones de temperatura (Figuras 3 y 4). Los resultados concuerdan con algunos trabajos que reportan el efecto del H₂O₂ como molécula señalizadora de regulación génica en bajas concentraciones (Levine *et al.*, 1994). El efecto inductor en concentraciones >1mM se observó en diferentes tiempos. A 20°C

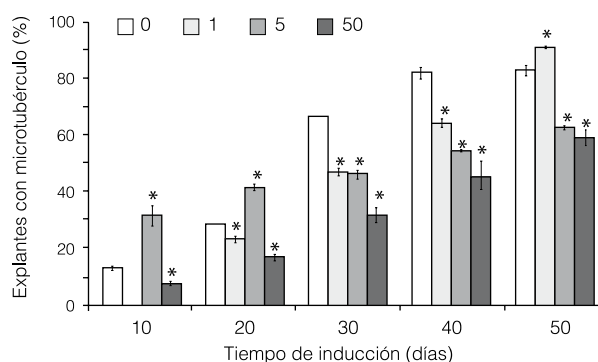


Figura 4. Porcentaje de explantes con tubérculo a 20°C durante un periodo de inducción de 50 días en oscuridad, previa incubación en H₂O₂ 0, 1, 5 y 50mM durante 1h y transferidos a cultivo *in vitro*. *Significativo con respecto al testigo. Tukey, p<0,005; n=20.

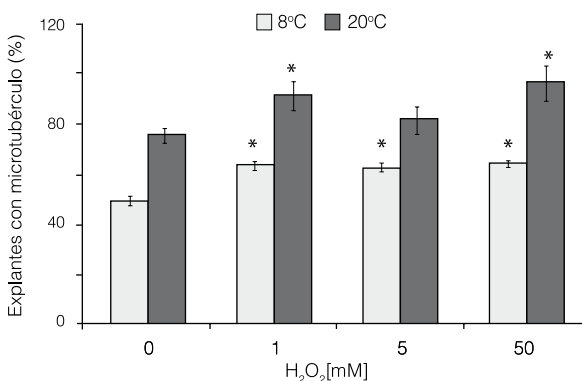


Figura 5. Peso de microtubérculos provenientes de explantes nodales preincubados en H₂O₂. Después de 60 días en oscuridad en medio de tuberización a dos temperaturas. *Significativo con respecto al testigo. Tukey, p<0,005; n=20.

el tratamiento con 5mM incrementó el porcentaje de tuberización a los 10 y 20 días de inducción, mientras que a 8°C el mismo efecto se observó a los 30 días, y para el tratamiento de mayor concentración (50mM) la inducción ocurrió entre los 30 y 40 días. La tuberización a 20°C fue significativamente mayor en el tratamiento con 5mM solo durante los primeros 20 días. Esto podría deberse a que el H₂O₂ en condiciones de no estrés es tóxico para las plantas cuando supera cierto rango de concentración. Bajo estrés de temperatura (8°C) se incrementó el número de explantes tuberizados antes que el testigo, probablemente activando diversos mecanismos de tolerancia a estrés por su papel como molécula señal (Figuras 3 y 4). Tolerancia a bajas temperaturas inducida por H₂O₂ en papa fue demostrada por Mora-Herrera *et al.* (2005) y por Mora-Herrera y López-Delgado (2006), quienes reportaron que 5 y 50mM H₂O₂ incrementan la supervivencia de microplantas después de la exposición a frío (-6 +1°C) durante 3 y 4h.

Peso de microtubérculos

El peso de los microtubérculos cosechados a los 60 días, fue significativamente mayor en los tratamientos con 1, 5 y 50mM H₂O₂ (62,95; 61,88 y 63,66mg, respectivamente) con respecto al testigo (48,83mg) a temperatura de 8°C. Con la temperatura de 20°C, los microtubérculos de los tratamientos con 1 y 50mM H₂O₂ presentaron peso significativamente mayor (91 y 96mg) que el testigo (75mg; Figura 5). López-Delgado *et*

al. (2005) reportaron que el tratamiento con H₂O₂ aumentó el contenido de almidón de tubérculos cosechados en campo y que, bajo condiciones de invernadero, el contenido de lignina también se incrementó. Estos autores proponen que probablemente el H₂O₂ afecta de manera indirecta la biosíntesis del almidón vía efectos en los mecanismos de señalización. En trabajos más recientes se demostró que H₂O₂ en bajas concentraciones externas (<20mM) actúa como señal para la síntesis y asimilación de azúcares solubles, incrementando el contenido de éstos en hojas y frutos (Ozaki *et al.*, 2008).

Número de microtubérculos por planta

A baja temperatura (8°C) los tratamientos con 1 y 5mM H₂O₂ presentaron un número significativamente menor de microtubérculos por planta que el testigo. A 20°C la concentración 5mM presentó mayor número de microtubérculos por planta, con 1mM fue significativamente menor y 50mM no presentó diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 6).

A 20°C la concentración 50mM H₂O₂ tuvo un efecto negativo sobre el porcentaje de tuberización, no así a 8°C, donde la planta se enfrentó a baja temperatura (Figura 3). En este caso, el pretratamiento con la misma concentración de H₂O₂ pudo actuar como molécula señal modificando el estado redox celular y activando el sistema antioxidante para favorecer la respuesta al posterior estrés por frío, como mencionan Mora-Herrera y López-Delgado. (2006), quienes reportaron que la preincubación de explantes nodales de papa en H₂O₂ durante 1h indujo el incremento en la actividad antioxidante de catalasa.

El tratamiento con 1mM de H₂O₂ resultó eficiente en la

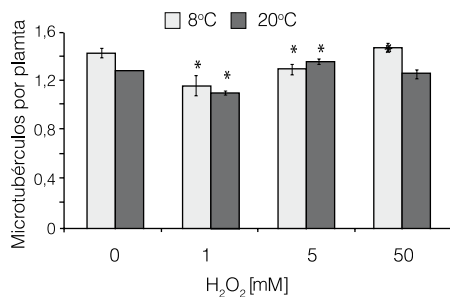


Figura 6. Número de tubérculos por explante, previa incubación en H₂O₂ e incubados a dos temperaturas después de 60 días de cultivo *in vitro* en oscuridad.

*Significativo con respecto al testigo (P≤0,05; n=28-36).

inducción, puesto que a esta concentración los explantes nodales incubados tuberizaron en mayor porcentaje que el testigo en ambas temperaturas. Los tubérculos de este tratamiento fueron más pesados, en menor número por planta y más grandes. El tamaño de los microtubérculos fue mayor en todos los tratamientos a 20°C que el de los obtenidos a 8°C.

Conclusión

El H₂O₂ es un inductor de la tuberización *in vitro* en plantas de papa, es un inhibidor del crecimiento y desarrollo vegetal, así como promotor de la supervivencia de explantes.

El uso de H₂O₂ como regulador del crecimiento, y las bajas concentraciones en las que actúa, le confiere una ventaja económica, ya que su costo es considerablemente bajo, comparado con el costo de cualquier otro regulador del crecimiento.

La microtuberización es una técnica útil para la producción de semilla certificada de papa. Por su origen y manipulación *in vitro*, conserva sus características fitosanitarias. Adicionalmente, su tamaño facilita el almacenamiento, transporte e intercambio de germoplasma.

REFERENCIAS

CIP (1988) *Informe Anual*. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 178 pp.

Fernie AR, Willmitzer L (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol.* 127: 1459-1465.

Foyer CH, López-Delgado H, Datt JF, Scott I (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Plant Physiol.* 100: 241-254.

García-Torres L, Gómez-Campo C (1973) *In vitro* tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberelic acid. *Potato Res.* 16: 73-79.

Hung S, Yu C, Lin CH (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.

Jackson SD (1999) Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol.* 119: 1-8.

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593

López-Delgado H, Scott I (1997) Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *J. Plant Physiol.* 151: 74-78.

López-Delgado H, Datt JF, Foyer HC, Scott I (1998a) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.* 49: 713-720.

López-Delgado H, Jiménez-Casas M, Scott I (1998b) Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetylsalicylic acid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54: 145-152.

López-Delgado H, Zavaleta-Mancera HA, Mora-Herrera ME, Vázquez-Rivera M, Flores-Gutiérrez FX, Scott I (2005) Hydrogen peroxide increases potato tuber and stem starch content, stem diameter, and stem lignin content. *Am. J. Potato Res.* 82: 279-285.

Mora-Herrera ME, López-Delgado HA, Castillo-Morales A, Foyer CH (2005) Salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiol. Plant.* 125: 430-440.

Mora-Herrera ME, López-Delgado HA (2006) Tolerancia a baja temperatura inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Rev. Fitotec. Mex.* 29: 81-85.

Mountain Valley (2003) *Variedades de Papa*. Mountain Valley Produce. www.myproduce.com (Cons. 15/11/2007).

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-497.

Ozaki K, Uchida A, Takabe T, Shinagawa F, Tanaka Y, Takabe T, Hayashi T, Hattori T, Rai AK, Takabe T (2008) Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. *J. Plant Physiol.* 166: 569-578.

Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx 1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J.* 34: 187-203.

Romero-Romero MT, López-Delgado HA (2009) Ameliorative Effects of Hydrogen Peroxide, Ascorbate and Dehydroascorbate in *Solanum Tuberosum* Infected by *Phytoplasma*. *Am. J. Potato Res.* 86: 218-226.

Rubio OA, Rangel JA, Flores R, Magallanes JV, Díaz C, Zavala TE, Rivera A, Cadena M, Rocha R, Ortiz C, López H, Díaz M, Paredes A (2000) *Manual para la Producción de Papa en las Sierras y Valles Altos del Centro de México*. SAGAR.INIFAP.CIR-CE. México. 481 pp.

Schopfer P (1996) Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening *in vitro* in maize coleoptiles. *Plant* 1999: 43-49.

Veramendi J, Willmitzer L, Trethewey RN (1999) *In vitro* grown potato microtubers are a suitable system for the study of primary carbohydrate metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 693-697.

Willekens H, Van Montagu ID, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Mol. Breed.* 1: 27-28.

Yu CW, Murphy TM, Sung W, Lin CH (2002) H₂O₂ treatment induces glutathione accumulation and chilling tolerance in mung bean. *Funct. Plant Biol.* 29: 1081-1087.

Yu CW, Murphy TM, Lin CH (2003) Hydrogen peroxide-induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Funct. Plant Biol.* 30: 955-963.