

TOLERANCIA A BAJA TEMPERATURA INDUCIDA POR ÁCIDO SALICÍLICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MICROPLANTAS DE PAPA

TOLERANCE TO LOW TEMPERATURE, INDUCED BY SALICYLIC ACID AND HYDROGEN PEROXIDE IN POTATO MICROPLANTS

Martha Elena Mora Herrera y
Humberto A. López Delgado*

Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Conjunto SEDAGRO. 52140, Metepec, Edo de México. Apdo. Postal 4-1. Tel y Fax 01 (722) 2 32 98 33.

*Autor para correspondencia (lopez.humberto@inifap.gob.mx)

RESUMEN

Se determinó el efecto del ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la tolerancia a baja temperatura ($-6 \pm 1^\circ C$), en microplantas de *S. tuberosum* de las variedades 'Alpha' y 'Atlantic'. Previamente se determinó la respuesta a baja temperatura de microplantas de 3 a 7 semanas de edad expuestas a baja temperatura por 2 ó 3 h, lo que permitió elegir modelo para la mínima supervivencia al de microplantas de 4 semanas de edad expuestas 3 h a baja temperatura. 'Alpha' fue más tolerante que 'Atlantic'. Esquejes de plantas producidos *in vitro*, fueron preincubados en H_2O_2 durante 1 h en concentraciones de 0, 0.1, 1, 5 y 50 mM y luego incubados por 4 semanas en medio MS; igualmente se cultivaron esquejes en medio MS en presencia de AS 0, 0.001, 0.01 y 0.1 mM durante 4 semanas. La supervivencia y la actividad catalasa fueron determinadas para todos los tratamientos. El tratamiento con AS 0.1 mM incrementó la supervivencia de 'Alpha' en 31 % y la de 'Atlantic' en 78 %, en relación con los testigos, mientras que el tratamiento de H_2O_2 50 mM produjo aumentos de 44 % en 'Alpha' y 92 % en 'Atlantic'. La actividad catalasa disminuyó en 37 % en 'Alpha' y en 36 % en 'Atlantic' en el tratamiento 0.1 mM de AS, mientras que en el tratamiento H_2O_2 50 mM la actividad catalasa se incrementó en 17 % en 'Alpha' y 28 % en 'Atlantic'. Estos resultados indican las diferentes rutas de señalización que pueden seguir el AS y H_2O_2 en la inducción de tolerancia a bajas temperaturas, lo que hace a estos compuestos potencialmente útiles para incrementar la tolerancia de *S. tuberosum* a baja temperatura.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, actividad catalasa, estrés por baja temperatura.

SUMMARY

The effects of salicylic acid (SA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) on freezing-tolerance ($-6 \pm 1^\circ C$) were studied on *S. tuberosum* mi-

croplants of cvs. 'Alpha' and 'Atlantic'. The response to low temperature was previously determined by exposing microplants 3-7 weeks-old for 2 or 3 h. Microplants 4 weeks old exposed for 3 h to low temperature were selected as a model for further experiments. 'Alpha' cultivar was more tolerant to freezing than 'Atlantic'. Nodal explants of both cultivars were incubated in H_2O_2 (0, 0.1, 1, 5, 50) mM for 1 h and allowed to grow in MS medium for 4 weeks. Nodal explants were also grown for 4 weeks in MS medium with SA (0, 0.001, 0.01, and 0.1 mM). Plant survival and catalase activity were measured in these treatments. The SA-treatment 0.1 mM enhanced survival by 31 % in 'Alpha' and by 78 % in 'Atlantic', relative to controls, whereas the H_2O_2 50 mM treatment induced an increment of 44 % in 'Alpha' and 92 % in 'Atlantic'. Catalase activity was 37 % lower in 'Alpha' and 36% in Atlantic in the SA 0.1 mM treatments, while in the H_2O_2 -treatment 50 mM the catalase activity increased 17 % in 'Alpha' and 28 % in 'Atlantic'. It is possible that SA and H_2O_2 may have contributed through different routes to freezing-tolerance signaling. These compounds are potentially useful for inducing freezing tolerance in potato microplants.

Index words: *Solanum tuberosum*, salicylic acid, hydrogen peroxide, catalase activity, freezing-stress.

INTRODUCCIÓN

En el sistema de producción de semilla "in vitro-invernadero-campo" de papa (*Solanum tuberosum* L.), son las bajas temperaturas invernales, que inciden aún en invernadero, porque alcanzan temperaturas bajo cero, las que ocasionan estrés en las plantas y daños en la productividad (Rubio *et al.*, 2000). Los cambios bruscos de temperatura durante las primeras etapas de germinación y emergencia de las plántulas inducen estrés en muchos cultivos, que alteran algunos procesos bioquímicos y fisiológicos y componentes celulares (Ding *et al.*, 2001).

La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es una de las primeras respuestas al estrés y son altamente destructivas de los componentes celulares (Scandalios, 2005). Las plantas expuestas a estrés acumulan ERO, como oxígeno en estado singulete (1O_2), superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ERO inhiben la función de algunas enzimas, dañan proteínas y lípidos de la célula. El incremento en la producción de derivados de oxígeno tóxico se considera como un indicador de condiciones de estrés oxidativo (Foyer y Noctor, 2005).

El H_2O_2 y el ácido salicílico (AS) están involucrados en las respuestas de aclimatación y tolerancia a bajas temperaturas; por ejemplo, el frío inhibe la actividad de la catalasa, lo que incrementa el contenido de H_2O_2 y la susceptibilidad al estrés oxidativo en plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), por lo que un aumento en la expresión de la actividad catalasa podría incrementar la tolerancia al estrés por frío (Kerdnaimongkol y Woodson, 1999). Se ha demostrado que las ERO, específicamente el H_2O_2 formado durante el estrés abiótico, es parte de la

señalización en cascada que permite la protección generalizada (Prasad *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997; Neill *et al.*, 2002), al inducir la expresión de genes relacionados con la defensa (León *et al.*, 1995; López-Delgado *et al.*, 1998; Dat *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1999). Además, el AS incrementa al H₂O₂ debido a la inhibición de catalasa, lo que ha sugerido que existen respuestas de tolerancia a estrés inducidas por AS (López-Delgado *et al.*, 1998; Dat *et al.*, 1998; López-Delgado *et al.*, 2004; Mora-Herrera *et al.*, 2005).

En este trabajo la papa se usó como modelo para estudios de estrés oxidativo, y para conocer algunos mecanismos involucrados en la regulación del sistema antioxidante causado por baja temperatura; específicamente para explorar el potencial de AS y H₂O₂ en la inducción de tolerancia a baja temperatura en papa y su relación con la actividad catalasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron microplantas de papa de las variedades 'Alpha' y 'Atlantic', del Banco de Germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología del Programa Nacional de Papa, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en Metepec, Estado de México. Las microplantas se derivaron de esquejes con una yema axilar sin hoja, que fueron subcultivados por 3 a 4 semanas en un medio Murashige y Skoog (1962, MS), como describen Espinoza *et al.* (1986).

Establecimiento del modelo de supervivencia a baja temperatura. Microplantas de 3 a 7 semanas de edad, se transplantaron a almácigos (30 x 50 mm) que contenían "peat moss" (mezcla Sunchine Canadá) como sustrato. A las 24 h se expusieron a dos periodos (2 o 3 h) de baja temperatura (-6 ± 1 °C), y luego se mantuvieron en condiciones de invernadero para su recuperación. La supervivencia se evaluó 15 d después de la exposición a baja temperatura, al considerar viva a la planta que tuviera al menos una yema axilar completamente verde y en crecimiento. Estos experimentos se realizaron siete veces con 12 microplantas por tratamiento en cada experimento, en un diseño completamente al azar. Estos experimentos se realizaron para definir un modelo con base en la mínima supervivencia, apegado al modelo *in vitro*-invernadero que se emplea en programas de producción de semilla. Una vez definido el modelo, fue usado en los experimentos posteriores.

Incubación en H₂O₂. Esquejes de microplantas se preincubaron por 1 h en concentraciones 0 (testigo), 0.1, 1, 5 y 50 mM de H₂O₂ como describen Mora-Herrera *et al.*

(2005); posteriormente se cultivaron en medio MS durante 4 semanas.

Incubación en AS. Esquejes de microplantas se cultivaron durante 4 semanas en medio MS con concentraciones de 0 (testigo), 0.001, 0.01 y 0.1 mM de AS.

Las microplantas obtenidas de las incubaciones con AS y H₂O₂ se sembraron en suelo, se expusieron a baja temperatura y la supervivencia se evaluó como se describió anteriormente. Ambos experimentos con AS y H₂O₂ se hicieron 7 y 6 veces, respectivamente, con 12 plantas por tratamiento. La cuantificación de la actividad catalasa se hizo en tres experimentos, con el método reportado por Dat *et al.* (1998), en microplantas de 4 semanas de edad antes de ser transplantadas a suelo, y además se registró la longitud de tallos y raíz. Los promedios de tratamientos se sometieron a la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante el programa Statgraphics plus 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La supervivencia se evaluó en microplantas provenientes de tratamientos con AS o H₂O₂ de 4 semanas de edad, transplantadas a suelo y expuestas a baja temperatura 3 h, con base en el modelo previamente establecido; este modelo permitió establecer el tiempo de cultivo *in vitro* (edad) y el tiempo de exposición a baja temperatura, en los cuales las variedades 'Alpha' y 'Atlantic' fueron más sensibles. Las microplantas expuestas a 3 h en baja temperatura mostraron el menor porcentaje de supervivencia ($P \leq 0.05$), que en 'Alpha' fue de 40.4 a 58.3 % y en 'Atlantic' de 21.4 a 27.3 % para 3 y 4 semanas de edad respectivamente, en comparación con las otras edades y tiempos de exposición (Figura 1). Se eligió como modelo de plantas *in vitro* el de 4 semanas porque fue una edad que presentó baja supervivencia y porque esta edad es la comúnmente empleada para subcultivo *in vitro* o para trasplante a invernadero en programas de producción de semilla (Rubio *et al.*, 2000).

El tratamiento de AS 0.1 mM indujo mayor tolerancia a la exposición a baja temperatura (Figura 2A). En 'Alpha' indujo un incremento de 28.8 % y en 'Atlantic' de 78.3 %, en relación con los testigos respectivos. La variedad 'Atlantic' que fue más sensible al frío, presentó mayor capacidad de respuesta al efecto del AS. Estos efectos son similares a los encontrados en plántulas jóvenes de maíz (*Zea mays* L.), en las que la aplicación de AS o ácido acetil salicílico (AAS) incrementó la protección a estrés por baja temperatura (Janda *et al.*, 1999; Janda *et al.*, 2000). Según Senaratna *et al.* (2000), estos mismos compuestos aumentaron la tolerancia a estrés por calor, frío y sequía

en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), debido a que estas moléculas inician la señalización para inducir tolerancia y resistencia, más que a un efecto directo. Scott *et al.* (1999) también sugirieron que la tolerancia y protección del AS se debe a su función en la señalización para la expresión de genes de defensa contra el estrés.

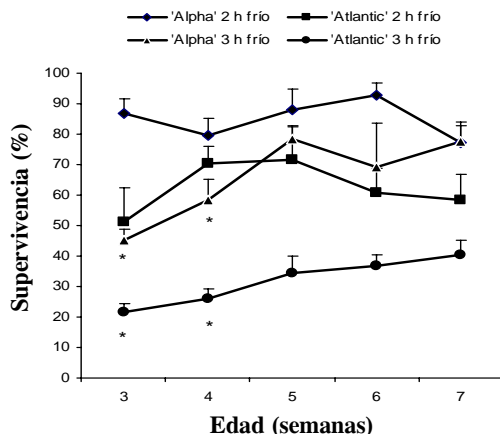
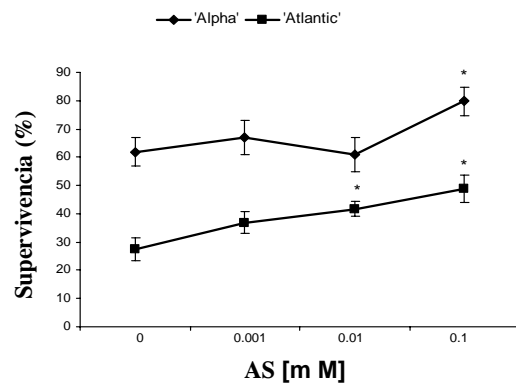


Figura 1. Supervivencia de microplantas de dos variedades de papa de diferentes edades (semanas) de incubación, trasplantedas a suelo y expuestas a baja temperatura (-6 ± 1 °C) por 2 y 3 h. Promedios de 7 experimentos \pm e.s. ($n = 12$); (*) Significativamente diferente (Tukey, 0.05).

Las microplantas cultivadas en presencia de AS mostraron inhibición en el crecimiento de tallos y raíces, inhibición que en la concentración de 0.1 mM fue hasta de 80 % con respecto a los testigos, en ambas variedades (datos no mostrados). Los efectos de los salicilatos sobre la morfología también fueron observados en papa (López-Delgado *et al.*, 1998), y en plantas jóvenes de maíz (Janda *et al.*, 1999). No obstante, los salicilatos pueden causar severos daños a las plantas porque disminuyen el proceso fotosintético, la conductividad estomática y la transpiración, lo que ocasiona estrés (Janda *et al.*, 2000). El estrés y la aclimatación son respuestas estrechamente vinculadas; por ejemplo, un leve estrés inducido por tratamientos químicos o por exposición a frío, parece beneficiar subsecuentemente a plántulas de maíz contra daño por frío (Prasad *et al.*, 1994). El efecto del AS aquí observado en las variedades de 'Alpha' y 'Atlantic', posiblemente fue similar a la aclimatación, considerada un fenómeno complejo, donde un ligero estrés oxidativo puede inducir tolerancia no sólo a frío sino también a otro tipo de estrés (Prasad *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 2001).

A



B

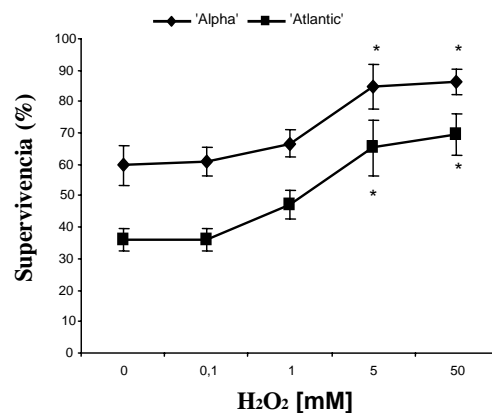


Figura 2. Supervivencia de microplantas de papa variedades 'Alpha' y 'Atlantic' de 4 semanas de edad: A) provenientes de esquejes cultivados en presencia de ácido salicílico ó B) preincubados 1 h en H₂O₂ y cultivadas 4 semanas en medio MS. Las microplantas fueron trasplantedas a suelo y expuestas a baja temperatura (-6 ± 1 °C) por 3 h. Promedio de 7-6 experimentos \pm e.s. ($n = 12$); (*) Significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Ningún tratamiento de H₂O₂ inhibió el crecimiento de tallos y raíces (datos no mostrados). El tratamiento de H₂O₂ 5 mM incrementó la supervivencia, la de 'Alpha' en 41 % y de 'Atlantic' en 80 %, con respecto a los testigos; el tratamiento 50 mM incrementó la supervivencia de 'Alpha' en 44 % y la de 'Atlantic' en 92 % (Figura 2B). Esta respuesta es complementaria a la reportada por Mora-Herrera *et al.* (2005), quienes encontraron que con 5 mM de H₂O₂ y 4 h de tratamiento de frío, se incrementó la supervivencia de microplantas de la variedad 'Atlantic', pero no en 'Alpha'; estos autores concluyeron que el H₂O₂ puede funcionar por rutas independientes de señalización para la inducción de tolerancia al frío. En el presente trabajo la concentración de 5 mM de H₂O₂ con 3 h de exposición a frío, sí incrementó la supervivencia en 'Alpha', lo que indica que la capacidad de respuesta al tratamiento está ligada a la intensidad del estrés y al genotipo. La participación de H₂O₂ en la inducción de tolerancia ha sido ampliamente

documentada; por ejemplo, el H_2O_2 en forma exógena disparó la tolerancia cruzada al estrés incluido el frío en plántulas de maíz (Gong *et al.*, 2001), y protegió a plántulas de maíz contra el estrés oxidativo causado por frío (Prasad *et al.*, 1994).

El H_2O_2 y el AS participan en la inducción de tolerancia al frío, lo que puede ser por incremento de H_2O_2 (Rao *et al.*, 1997) o por incremento en el AS (León *et al.*, 1995), porque ambos inducen proteínas de tolerancia. En microplantas incubadas por 4 semanas en presencia de AS, la actividad catalasa disminuyó (Figura 3A), lo que confirma que el AS inhibió la actividad catalasa y eso condujo a la acumulación de H_2O_2 (Chen *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997; López-Delgado *et al.*, 1998; Dat *et al.*, 1998). Algunos investigadores sugieren que la inhibición de la actividad catalasa no es necesariamente el principal mecanismo por el cual se acumula H_2O_2 . Una función directa del AS puede ser potenciar la producción de H_2O_2 por la NAD(P)H oxidasa de la membrana plasmática (Kauss y Jeblick, 1996). Sin embargo, en este trabajo la tolerancia a la baja temperatura puede ser explicada por una baja actividad catalasa inducida por AS, pues se ha demostrado que en papa provoca incremento en el contenido de H_2O_2 (López-Delgado *et al.*, 1998), tal vez al actuar como señal para la transcripción de genes de defensa. Es probable entonces que la inhibición de la actividad catalasa por el AS observada en las variedades 'Alpha' y 'Atlantic', permitiera un aumento en el contenido de H_2O_2 en la etapa de cultivo *in vitro*, lo que pudo ser la señal que desencadenó las respuestas de tolerancia por exposición a baja temperatura; en papa también se ha sugerido la inducción de tolerancia a calor por ASA (López-Delgado *et al.*, 1998).

En las microplantas preincubadas con H_2O_2 , la actividad catalasa presentó la tendencia de aumentar al incrementarse la concentración de H_2O_2 , en ambas variedades, y fue significativamente diferente en concentraciones de 5 y 50 mM con respecto a los testigos (Figura 3B). Este resultado sugiere que la preincubación de los esquejes en H_2O_2 por 1 h pudo haber inducido la actividad de enzimas antioxidantes, entre ellas la catalasa (Figura 3B). Al respecto, Prasad *et al.* (1994) encontraron en plántulas de maíz que las aplicaciones de H_2O_2 incrementaban la actividad de CAT3 y peroxidasas, por lo que parece haber un efecto dual del H_2O_2 en las respuestas a frío de las plántulas; por una parte, el H_2O_2 endógeno contribuye a la muerte de la plántula y por otro lado induce tolerancia al frío. El aumento de la actividad catalasa coincide con un incremento en la tolerancia a la exposición a bajas temperaturas (Figuras 2B y 3B).

En conclusión, el AS y el H_2O_2 son compuestos potencialmente útiles para incrementar la tolerancia de *S. tuberosum*

a estrés por exposición a baja temperatura. Los tratamientos con AS y H_2O_2 fueron más eficientes para incrementar la tolerancia a la exposición a baja temperatura en la variedad 'Atlantic' que en la variedad 'Alpha', porque la primera es más susceptible a dicho estrés. La capacidad de repuesta al tratamiento parece estar ligada a la intensidad del estrés y al genotipo. La variedad 'Alpha' mostró ser más tolerante al frío que 'Atlantic'. El modelo aquí generado permite estudiar un estrés abiótico como el frío en forma reproducible y en corto tiempo.

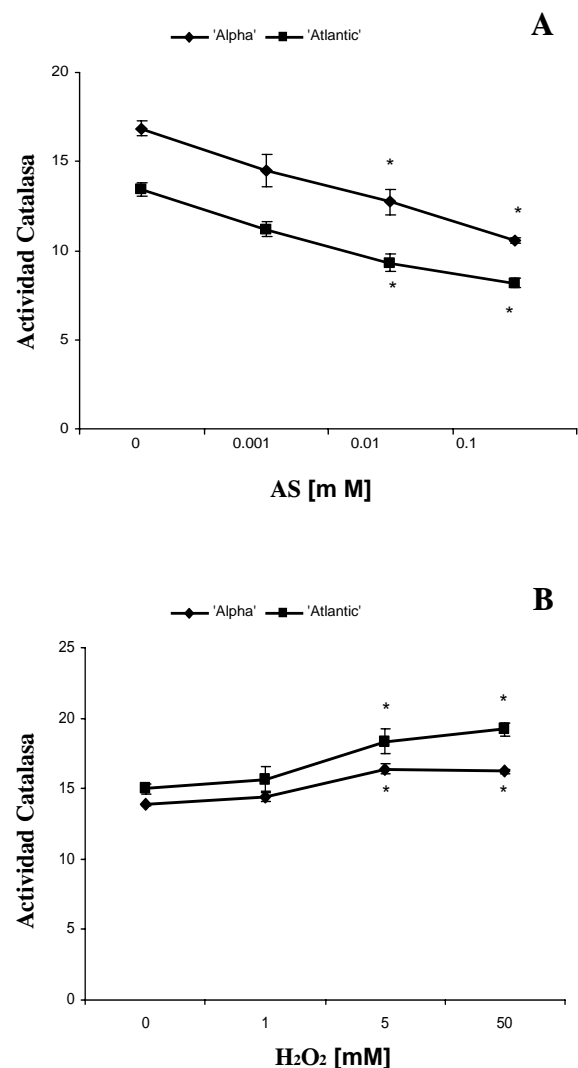


Figura 3. Actividad catalasa en microplantas de papa variedades 'Alpha' y 'Atlantic' de 4 semanas de edad: A) provenientes de esquejes cultivados en presencia de ácido salicílico ó B) esquejes preincubados 1 h en H_2O_2 y cultivados 4 semanas en medio MS. La actividad catalasa se expresa en $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de tejido. Los resultados son promedio de tres experimentos \pm e.s. ($n = 12$); (*) Significativamente diferentes con respecto al testigo (Tukey, 0.05).

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo otorgado con una beca de estudiante de posgrado y financiamiento a través del Proyecto SEP/CONACYT/2003/CO2/45016.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen Z, S Iyer, A Caplan, D F Klessing, B Fan (1997) Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* 114:193-201.
- Dat J F, H López-Delgado, C H Foyer, I M Scott (1998) Paralell changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116:1351-1357.
- Ding C, C Y Wang, K C Gross, D L Smith (2001) Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Sci.* 161:1153-1159.
- Espinoza N O, R Estrada, D Silva-Rodriguez, P Tovar, R Lizarraga, J H Dodds (1986) The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture* 15:21-26.
- Foyer C H, Noctor G (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28:1056-1071.
- Gong M, B Chen, Z G Li, L H Guo (2001) Heat -shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedling and involvement of H₂O₂. *J. Plant Physiol.* 158:1125-1130.
- Janda T, G Salía, Z Antunovics, E Horváth, E Páldi (2000) Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* 45:29-33.
- Janda T, G Szalai, E I Tari, Páldi E (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreased the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208:175-180.
- Kauss H, W Jeblick (1996) Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation (Comparison of ergosterol with other rlicitors). *Plant Physiol.* 111:755-763.
- Kerdnaimongkol K, W R Woodson (1999) Inhibition of catalase by antisense RNA increases susceptibility to oxidative stress and chilling injury in transgenic tomato plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124:330-336.
- León J, M A Lawton, I Raskin (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108:1673-1678.
- López-Delgado H, J F Dat, C H Foyer, I M Scott (1998) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.* 49 (321):713-720.
- López-Delgado H, M E Mora-Herrera, H A Zavaleta-Mancera, M Cadena-Hinojosa, I Scott (2004) Salicylic acid enhanced heat-tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *Amer. J. Pot. Res.* 81:161-166.
- Mora-Herrera M E, H López-Delgado, A Castillo-Morales, C H Foyer (2005) Salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiol. Plant.* 125:430-440.
- Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays whit tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Neill S J, R Desikan, J T Hancock (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Op. Plant Biol.* 5:388-395.
- Prasad T K, M D Anderson, B A Martin, C R Stewart (1994) Evidence for chilling -induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Rao M V, G Paliyath, D P Ormrod, D P Murr, C B Watkins (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 115:137-149.
- Rubio C O A, J A Rangel G, Flores L, J V Magallanes G, C Díaz H, T E Zavala Q, A Rivera P, M Cadena H, R Rocha R, C Ortiz T, H López D, M Díaz V, A Paredes T (2000) Manual para la Producción de Papa en las Sierras y Valles Altos del Centro de México. SAGAR. INIFAP. CIRCE. Campo Experimental Valle de Toluca. Libro Técnico No 1. 481 p.
- Scandalios J G (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 38:995-1014.
- Scott I M, J F Dat, H López-Delgado, C H Foyer (1999) Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signaling in plants. *Phyton* 39:13-17.
- Senaratna T D, Touchell , E Bunn, K Dixon (2000) Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Reg.* 30:157-161.