

31967



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

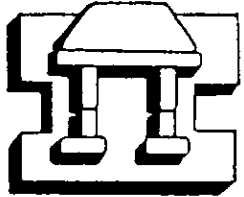
CAMPUS IZTACALA

12g.

EFFECTO DEL CALOR EN EL DESARROLLO Y EL PATRON DE SINTESIS DE PROTEINAS DE Solanum tuberosum L.

T E S I S QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA DE RECURSOS VEGETALES) P R E S E N T A MARIA DEL SOCORRO SANCHEZ CORREA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE I. SAROUI RAMIREZ



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. MEX.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

26 8343



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO ENIZ/DEP/953/98.

ASUNTO: *Conformación de Jurado para Examen de Grado.*

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
Director General de Administración Escolar
Presente.

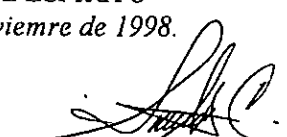
*Por medio de la presente informamos a usted la conformación del Jurado encargado del Examen que la alumna **MARÍA DEL SOCORRO SÁNCHEZ CORREA**, con número de cuenta 8955675-1 y número de expediente 300961005, sustentará con objeto de obtener el grado de Maestra en Biología de Recursos Vegetales:*

<i>Presidente:</i>	<i>Dr. Alejandro Blanco Labra</i>
<i>Vocal:</i>	<i>Mtro. Sergio Vaca Pacheco</i>
<i>Secretario:</i>	<i>Dr. Jorge Sarquis Ramírez</i>
<i>Suplente:</i>	<i>Mtro. Ignacio Peñalosa Castro</i>
<i>Suplente:</i>	<i>Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras</i>

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo

Atentamente.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ios Reyes Iztacala, a 9 de noviembre de 1998.

~~*DR. FELIPE MIRADO SEGURA*~~
~~*Director de la ENEP Iztacala*~~


DRA. MARÍA SUÁREZ CASTILLO
Jefa de la División de Estudios de
Posgrado

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FISIOLOGÍA VEGETAL DE LA UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS DE LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; CON LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE I. SARQUÍS RAMÍREZ Y CON UNA BECA OTORGADA POR LA DGAPA, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A:

Dr. Jorge I. Sarquís Ramírez

Dra. Patricia D. Dávila Aranda

Dr. Alejandro Blanco Labra

M. en C. Sergio Vaca Pacheco

M. en C. Ignacio Peñalosa Castro

M. en C. Roberto Velasco García

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

A René por los 13 años de la vida de ambos.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Introducción	3
Objetivos	14
Metodología	15
Material vegetal	15
Cultivo de las progenies	15
Elección de progenies	16
Expresión de termotolerancia	16
Efecto del calcio en la expresión de termotolerancia	16
Permeabilidad de la membrana	17
Viabilidad	17
Cambios en el contenido de proteínas	18
Resultados	20
Elección de progenies	20
Expresión de termotolerancia	25
Efecto del calcio en la expresión de termotolerancia	27
Cambios en el contenido de proteínas	30
Discusión	36
Bibliografía	44

RESUMEN

La papa es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, actualmente es cultivada en casi todas las regiones del mundo; sin embargo, uno de los problemas más graves a los que se enfrenta la diversificación de esta actividad, en países como México, es el efecto de las altas temperaturas que predominan la mayor parte del año en muchas regiones, que de otra manera no tendrían impedimento para la introducción del cultivo de esta especie. Por ello, es importante la identificación de variedades que puedan desarrollarse exitosamente a temperaturas elevadas, además de tratar de conocer algunos de los aspectos que participan en su tolerancia a la temperatura. En este trabajo, a partir de una muestra de germoplasma se seleccionó a MFII x TS10 y a Chiquita x TS9, como progenies resistente y susceptible al calor respectivamente, en base a las alteraciones causadas por la exposición a un régimen de 38/22°C D/N durante todo el ciclo de vida de las plantas. En ambas progenies se evaluó el efecto del choque térmico y del calcio en la expresión de termotolerancia, encontrando que en el caso del choque térmico, el tratamiento de las plantas a 32°C durante 2 h brindó la mayor termoprotección tanto en MFII x TS10 como en Chiquita x TS9. Por otro lado la aplicación de calcio durante la germinación (CaCl_2 5mM), aparentemente indujo la expresión de termotolerancia aunque no tan efectivamente como el choque térmico; adicionalmente se observó que no existía sinergia con la aplicación de ambos tratamientos.

Se detectaron varias alteraciones en el contenido de polipéptidos de ambas progenies por efecto del calor, sobre todo la aparición en MFII x TS10 de un polipéptido de 115 kDa en las plantas desarrolladas a 38/22°C D/N, y la aparición

de varios polipéptidos nuevos en esta misma progenie por efecto del choque térmico, los cuales proponemos como posibles marcadores bioquímicos de termotolerancia.

INTRODUCCIÓN

La papa se encuentra dentro de las cinco especies cultivadas más importantes a nivel mundial, sólo precedida por el maíz, el arroz y el trigo (Ross, 1986). Esta planta se cultiva de manera intensiva en muchas zonas de varios países americanos, africanos, europeos y asiáticos, su uso se extiende desde el consumo de los tubérculos en fresco, hasta su empleo en la industria del alcohol y licores, como forraje para el ganado o en la industria de los alimentos procesados como papas fritas, féculas, purés deshidratados, etc. En México, a pesar de ser uno de los países con mayor número de especies silvestres del género *Solanum* (36 especies), el consumo y cultivo de papa no han adquirido tanta importancia como en otros lugares; sin embargo, la papa resulta una buena alternativa para la solución del problema alimentario mexicano, debido a su alto rendimiento por unidad de área cultivada y a sus grandes cualidades nutritivas, ya que posee proteínas de buena calidad y tiene un alto contenido de carbohidratos (22 g de 150 g de peso fresco total) (Maldonado, 1982).

La papa se clasifica dentro de la clase Magnoliopsida (Dicotiledóneas), familia Solanaceae, género *Solanum*, subgénero *Potatoe*, sección *Petota* y especie *S. tuberosum* (Hawkes, 1990). Las plantas de esta especie son herbáceas, ramificadas, anuales; su tamaño oscila entre los 0.3 y 1 m de altura, las raíces son finas, fibrosas y adventicias; producen estolones que crecen horizontalmente a través del suelo. En estadios avanzados, los estolones forman tubérculos que son tallos subterráneos modificados por hinchamiento y proliferación celular; en su superficie se observan algunos pliegues llamados “ojos” a partir de los cuales comienzan a desarrollarse los “brotes”, que son las estructuras que darán origen a

una nueva planta. Por esta razón, los tubérculos son utilizados como medio de propagación en el cultivo de la papa, recibiendo el nombre de "semilla tubérculo". Las hojas son pinadas o compuestas con pequeñas yemas foliares insertadas entre las pinas principales; las flores se presentan en inflorescencias, son pentámeras con la típica estructura de la familia, son de color blanco, rojo o púrpura, el fruto es una pequeña baya bicarpelada en la cual se producen gran cantidad de semillas (Figura 1) (Porter, 1967), algunas variedades cultivadas no producen frutos (Page, 1982).

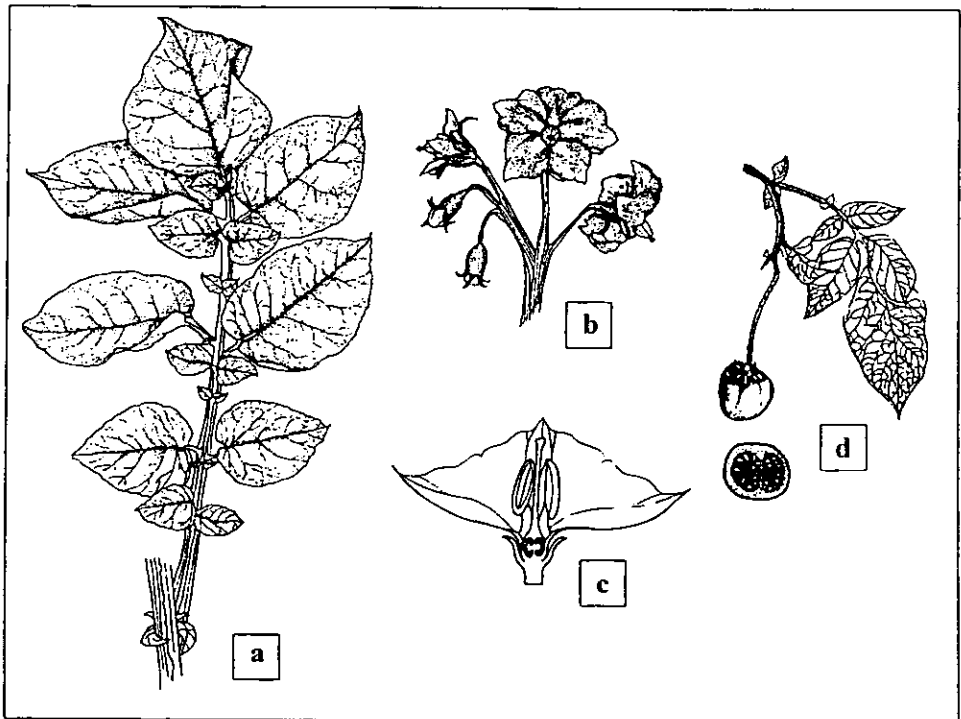


Figura 1. Esquema de las diferentes estructuras de una planta de *S. tuberosum*. a) Hoja, b) Inflorescencia, c) Esquema floral y d) Fruto.

La papa es originaria de América del Sur, su centro de origen se encuentra en los Andes, en la región comprendida entre el centro de Perú y el centro de Bolivia, aproximadamente entre los 10° N y 10° S, donde la altitud media es de 2100 msnm (Purseglove, 1987). Existen evidencias arqueológicas de que su domesticación se inició en dos regiones diferentes del sur de América, una en el sudeste de Chile hace 13 000 años y una segunda en la costa de Perú hace 7 000 años (Ugent, 1987), por lo menos 6 000 años antes del florecimiento de la cultura Inca. El cultivo de la papa fue sumamente importante para los Incas, llegando a constituir la base de su alimentación. De la zona andina el cultivo fue llevado por varios pueblos prehispánicos hacia el sur y el norte de América, extendiéndose a casi todo el continente excepto Estados Unidos y Canadá.

La papa fue introducida del sur de América a Europa después del descubrimiento y conquista de los nuevos territorios por los españoles hacia el año 1570; posteriormente, con las actividades de piratería realizadas por los Ingleses sobre los barcos españoles Sir Walter Raleigh lleva esta especie, como parte del botín, a Inglaterra en el año de 1586. A partir de estas dos introducciones el cultivo de la papa se difunde por varias regiones y cobra su mayor importancia hasta 1663, cuando en Irlanda se hace el primer cultivo masivo de esta planta; éste se continúa por casi dos siglos debido al creciente aumento en el consumo de los tubérculos. En el año de 1845 los cultivos fueron atacados por el hongo *Phytophthora infestans*. Debido a la uniformidad genética causada por el manejo clonal asociado con la propagación o reproducción vegetativa de la papa, el ataque originó grandes pérdidas para los productores, con lo cual el cultivo disminuyó enormemente. Sin embargo esta actividad continuó y en poco tiempo se recuperó con la introducción de nuevas variedades y el inicio del cultivo en regiones diferentes (Hawkes, 1967).

El cultivo de la papa no sólo se extendió en Europa sino que de allí pasó incluso a otros continentes, así en 1600 el cultivo se introdujo a la India, a los Estados Unidos de América en la región de Nueva Inglaterra hacia 1719, a Japón en 1766 al mismo tiempo que en Java; y hacia el siglo XIX se introdujo al este de África incluyendo las tierras altas de Kenia. Actualmente la papa es cultivada a latitudes comprendidas entre los 55°N y 50 °S y altitudes hasta de 4000 msnm, en casi todos los climas del mundo excepto en los bosques tropicales, debido a su naturaleza altamente adaptativa.

La diversidad de ambientes en que actualmente se cultiva la papa se ha incrementado no sólo buscando los sitios que presenten las condiciones adecuadas para su desarrollo, sino también a través de la selección de clones resistentes a una o varias condiciones ambientales desfavorables. Se estima que los cultivos de papa son susceptibles a más de 250 plagas y enfermedades relacionadas con el ataque de insectos y microorganismos, así como a las temperaturas superiores o inferiores a su intervalo óptimo de desarrollo, a la sequía, y a la deficiencia o exceso de nutrimentos (Desborough, 1985). En México, como en otros países de clima tropical donde el cultivo de papa tiene un alto potencial, uno de los principales problemas que enfrenta esta actividad es el efecto de las altas temperaturas que prevalecen la mayor parte del año en zonas que de otra manera no tendrían impedimento para la introducción del cultivo.

El intervalo óptimo de temperatura en la que se desarrolla *S. tuberosum* es de los 20 a 25°C; las plantas mantenidas a temperaturas por encima de este intervalo sufren alteraciones tanto a nivel morfológico como a nivel fisiológico y bioquímico (Vander Zaag, 1983). Las respuestas de las plantas al incremento de la temperatura están determinadas por la compleja interacción de varios factores como el

desarrollo de las plantas, el manejo del cultivo y los factores ambientales, especialmente flujo de irradiación y fotoperiodo; aunque el grado de sensibilidad está determinado por el acervo genético de cada variedad o clon (Lazin, 1980; cit. Desborough, 1985).

La germinación de las semillas se lleva a cabo entre los 15 y 20°C, las temperaturas por encima de los 25°C suelen inhibirla, aunque no necesariamente se afecta la viabilidad de los embriones (Baoy, 1982). Sin embargo, existen pocos trabajos respecto al efecto de la temperatura sobre la germinación o del crecimiento inicial de la planta en esta condición.

Si las plantas se desarrollan en condiciones de calor (de 30°C o mayores), ya sea en invernadero o plantaciones en campo, se observa un marcado retraso en la formación de los tubérculos, llegando en las variedades más susceptibles a la inhibición completa (Krauss, 1984); además, la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo del almidón disminuye o se inhibe completamente (Morpurgo, 1986). Aparentemente tanto la inhibición de la formación de los tubérculos como el alargamiento del tallo que se presenta por efecto del calor son consecuencia del aumento de los niveles de giberelinas en la planta como respuesta al incremento de la temperatura; por el contrario, cuando las plantas son expuestas a bajas temperaturas, se incrementa la concentración interna de antagonistas de las giberelinas, como el ácido abscísico, causando un limitado alargamiento del tallo y la inducción de la formación de tubérculos. La reducción del crecimiento radicular también es una consecuencia directa del incremento de la temperatura. Aparentemente el balance hormonal de las plantas sometidas a estrés térmico altera tanto la formación de tubérculos como el desarrollo radicular (Menzel , 1980).

El calor también afecta la parte aérea de las plantas. Una de las respuestas generales de las plantas cuando son expuestas al calor es la alteración de las tasas de asimilación de CO₂, las cuales disminuyen significativamente; mientras que las tasas respiratorias se incrementan. La reducción en la fotosíntesis se debe aparentemente al decremento en la actividad del sistema mesofilico de las hojas, puesto que la actividad de la RUBISCO (Ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa) también disminuye. Otra de las respuestas inmediatas es la tendencia a la apertura estomática, con lo cual se incrementa la transpiración (Sarquís, 1996). Estas respuestas ocasionan que la asimilación neta del carbono se vea mermada por efecto del incremento de la temperatura (Wolf, 1990). Bajo estas condiciones se reduce el tiempo de vida de las hojas, las cuales tienden a engrosarse en lugar de alargarse disminuyendo así el área foliar total (Escobar, 1988).

Un fenómeno importante que se presenta en las plantas de papa es la considerable capacidad adaptativa del aparato fotosintético a las altas temperaturas, es decir, después de un periodo generalmente corto de exposición al calor, el sistema fotosintético tiende a restablecer su actividad normal, aunque la temperatura se mantenga elevada, siempre y cuando la disponibilidad de agua no sea limitante (Midmore, 1991.).

Otro efecto importante del calor en las plantas de papa es la alteración que sufre el metabolismo de los carbohidratos, en este sentido se ha observado que debido al estrés térmico se incrementa la acumulación de sacarosa en las hojas maduras y la acumulación de almidón disminuye, mientras que los niveles de glucosa se mantienen sin cambios; esto se traduce en escasez de almidón para todo el resto de la planta, lo que causa que el llenado de los tubérculos disminuya o incluso en los clones más susceptibles se detenga (Lafta, 1995).

La explicación más común del daño por calor en todos los sistemas biológicos es la alteración de las proteínas, sobre todo a dos niveles sumamente importantes, uno es el sistema enzimático y otro la membrana plasmática; por ello los métodos más utilizados para la determinación de la susceptibilidad de las plantas al calor tiene que ver con ambos aspectos (Chen, 1982). Para determinar la susceptibilidad de la membrana es posible cuantificar los electrolitos liberados por el tejido expuesto al calor por conductimetría (Morpurgo op. cit.). Por otro lado, los cambios en la actividad enzimática pueden medirse por la capacidad de ciertos compuestos para captar electrones, los cuales son liberados por las reacciones enzimáticas, de manera que mientras mayor sea la actividad enzimática mayor será también la reducción del compuesto; uno de éstos es el 2,3,5-cloruro de trifenil tetrazolio, el cual al reducirse cambia su coloración haciendo posible medir la liberación de electrones por colorimetría; de manera que ante la inhibición de la actividad enzimática se registra una menor reducción del compuesto (Steponkus, 1967).

Desde hace tiempo y para muchas especies vegetales se han reportado alteraciones en el contenido o en la síntesis normal de proteínas, estos cambios dependen directamente del genotipo de las plantas. En papa se conocen las alteraciones en la síntesis de algunas proteínas asociadas con uno o varios tipos de estrés, principalmente en células de tubérculo; sin embargo, se desconocen con detalle los cambios producidos por el estrés térmico a este nivel en el resto de los tejidos de la planta. La electroforesis de extractos de proteínas de tejidos expuestos a calor permite detectar la aparición o desaparición de proteínas, su incremento o disminución por efecto del estrés térmico. Estos cambios pueden utilizarse como marcadores de resistencia al calor en esta especie, ya que los métodos que existen

actualmente para determinar la termotolerancia se basan en el monitoreo de las modificaciones en el desarrollo de las plantas en uno o varios ciclos de cultivo en invernadero o en campo (Sattelmacher, 1993).

Existen dos tipos de respuesta asociadas con el incremento de la temperatura: una es la que se presenta cuando las plantas se desarrollan durante todo su ciclo de vida en estas condiciones, la otra es la desencadenada por la exposición repentina al calor durante un lapso breve, conocida como choque térmico. La mayoría de los reportes sobre la respuesta de las plantas al calor permanente se refiere a parámetros morfológicos y fisiológicos, tales como crecimiento (Escobar, op. cit.), fotosíntesis (Havaux, 1994.), rendimiento (Levi, 1986), etcétera. En cuanto al choque térmico, en papa se han determinado cambios en la expresión de varias proteínas en respuesta a este estímulo (Garbarino, 1992) y a varios tipos de estrés como el daño mecánico, sequía y estimulación con etileno externo; estas proteínas son ubiquitina, fenilalanina amonio liasa y ciertos tipos de proteínas de la familia de las HSP70 (Rickey, 1991). Aparentemente estas proteínas tienen cierta función protectora como "chaperonas" en las células en las que son sintetizadas.

La respuesta al choque térmico da como resultado la síntesis de un pequeño número de proteínas, seguida de la disminución en la expresión de las proteínas normalmente expresadas en los organismos. Las proteínas sintetizadas en respuesta al choque térmico se conocen como proteínas de choque térmico o HSPs (siglas derivadas del inglés Heat Shock Proteins). Una vez que la temperatura regresa a sus valores normales, la síntesis normal de proteínas se reanuda gradualmente, al tiempo que cesa la producción de HSPs (DiDomenico, 1982).

La respuesta al choque térmico es universal, se ha detectado en organismos como arqueobacterias, eubacterias, plantas y animales como moscas, peces e incluso mamíferos (Lindquist, 1986). Las proteínas de choque térmico se han asociado con funciones protectoras diversas, ya que no sólo se producen por efecto del calor sino también por varias alteraciones ambientales como el ataque de patógenos, daño mecánico y sequía (Garbarino, op. cit.), aunque en menor medida. Algunas HSPs se producen durante eventos normales del desarrollo de los organismos (Ougham, 1988), como la embriogénesis somática (Györgyey, 1991) y la maduración de las semillas (Wehmeyer, 1996).

Debido a su estructura altamente conservada las HSPs se han agrupado en diferentes familias de acuerdo con sus masas moleculares o a los organismos en los que se han encontrado (Cuadro 1), las funciones de algunas proteínas en particular son conocidas, sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce el papel específico de las HSPs.

Cuadro 1. Proteínas de respuesta a estrés con funciones conocidas (Modificado de Morimoto, et al. 1990).

Familia	Proteínas reportadas		Función
	Eucariontes	Procariontes	
HSP 90	hsp 83, 87	HtpG (C62.5)	Se unen a polipéptidos específicos impidiendo su función y/o los escoltan a su compartimento celular.
HSP 70	hsp68, 72, 73; BiP; grp75, 78, 80; hsc70; KAR2; SSA1, 2, 3, 4; SSB1, 2; SSC1; SSD1.	DnaK	Disocian algunos agregados de proteínas. Mantienen algunos polipéptidos en estado no plegado, facilitando su translocación a través de las membranas y/o acelerando su plegamiento y oligomerización. Se unen a polipéptidos específicos.

HSP 60	hsp58; proteína que se une a RuBisCO; MIF4.	GroEL (MopB)	Mantienen algunos polipéptidos en estado no plegado, facilitando su translocación a través de las membranas y/o acelerando su plegamiento y ensamble
Dna J	SEC63 (NPL) SIS1	DnaJ	Se unen a polipéptidos específicos. Aceleran la liberación de algunos de los polipéptidos unidos a DnaK (?). Interaccionan con DnaK y GrpE.
GrpE	Proteína antigénicamente relacionada	GrpE	Interacciona con DnaK y DnaJ. Aceleran la liberación de algunos de los polipéptidos unidos a DnaK (?).
smHSP	hsp 17.5, 22, 23, 26; GENE 3	HtrC	En plantas se unen a proteínas parcialmente desnaturalizadas, impidiendo su agregación e inactivación irreversible. Su actividad de chaperonas contribuye al desarrollo de termotolerancia.
Ubiquitina	UBI1, 2, 3, 4.	Ninguna	Se conjugan con polipéptidos desnaturalizados y los "señalan" para ser destruidos

Muchas de estas proteínas se expresan constitutivamente en las células, su papel es unirse a los nuevos polipéptidos para favorecer el plegamiento y adquisición de su estructura funcional. Parece ser que los factores de transcripción de las HSPs se encuentran unidos a estas moléculas, de manera que en las células estresadas estos factores son liberados e inducen la producción de las HSPs (Hightower, 1991). La familia de proteínas de choque térmico que se expresan principalmente en plantas durante el estrés térmico es la smHSP, a diferencia de otros eucariontes en los que se expresan preferentemente las HSP70 (Waters, 1996).

La intensidad de la temperatura que induce la respuesta de choque térmico varía de acuerdo con el intervalo normal de exposición de cada organismo en particular. En organismos que crecen a intervalos de temperatura amplios, la máxima respuesta se obtiene entre los 10 y 15°C por encima de su temperatura

óptima; en cambio, en los organismos que se desarrollan a intervalos más estrechos la respuesta máxima se obtiene aproximadamente a los 5°C por encima de su temperatura óptima (Hahn, 1990).

Un aspecto muy importante de la síntesis de las HSPs es que su expresión incrementa la termotolerancia en los organismos sometidos a choque térmico (Lin et al. 1984). El incremento en termotolerancia se manifiesta como la capacidad de continuar con la síntesis de proteínas a una temperatura por encima de la óptima, en la cual esta síntesis podría disminuir o inhibirse completamente; además, el efecto más evidente es el incremento en la viabilidad del tejido pretratado con choque térmico y sometido después a calor permanente, a una temperatura que puede causar la muerte del tejido no pretratado (Ougham, op. cit.). Recientemente se ha encontrado que los niveles de calcio intracelular se incrementan como consecuencia del estrés térmico, tanto en plantas (Klein, 1987) como en animales (Mosser, 1990), lo cual sugiere que este catión participa en la adquisición de termotolerancia; sin embargo, no existe evidencia directa sobre su papel en este proceso (Gong et al. 1997).

Las respuestas originadas por el calor en las plantas son muy variadas, por ello es importante conocerlas, sobre todo cuando se pretende cultivar especies originarias de climas fríos o templados en regiones tropicales caracterizadas por la presencia de altas temperaturas la mayor parte del año; éste es el caso de la papa, especie que tiene un alto potencial de cultivo en nuestro país. Entre los aspectos más importantes en este sentido está la selección de progenies resistentes al calor y la identificación de "marcadores moleculares" de fácil detección que pudieran indicar dicha resistencia.

OBJETIVOS

1. Comparar 6 progenies de *S. tuberosum* L. para seleccionar dos con fenotipos contrastantes (resistente y susceptible) en respuesta al calor.
2. Medir el daño en el crecimiento y el rendimiento causado por el incremento en la temperatura en dos progenies de *S. tuberosum* L. con fenotipos contrastantes.
3. Determinar la influencia del calcio en la adquisición de termotolerancia en plántulas de *S. tuberosum* L.
4. Precisar el pretratamiento térmico que proporcione una mayor termotolerancia a las plántulas de ambas progenies expuestas a la temperatura letal.
5. Distinguir los cambios en la síntesis de algunas proteínas identificándolas como posibles marcadores de la resistencia al calor en *S. tuberosum* L.

METODOLOGÍA

Material vegetal.

Se usaron las progenies TS9 x TPS113, MFII x TS10, LT8 x TS9, MFII x TS9, Serrana x TS5 y Chiquita x TS9 donadas por el Programa de Fisiología del Centro Internacional de la Papa. Estas progenies constituyen una muestra de germoplasma de amplia base genética, pues incluye parentales femeninos tetraploides seleccionados por sus bondades agronómicas, así como parentales masculinos dihaploides (Híbridos haploides de especies silvestres), seleccionados por características de floración adecuada bajo día corto y por su resistencia a tizón tardío.

Cultivo de las progenies.

Las plantas se obtuvieron a partir de semilla sexual de papa (SSP), para ello se germinaron semillas de todas las progenies en macetas de 50 x 20 x 15 cm en una mezcla de agrolita y turba 1:1; las plantas se mantuvieron en invernadero a 22/18°C día/noche con fotoperiodo de 12 h, riego diario y fertilización semanal con "triple 17" (nitrógeno, fósforo y potasio 17:17:17).

Por otro lado se germinaron semillas en cajas Petri sobre una cama de algodón y gasa humedecida con agua destilada, previamente esterilizada; las plántulas se desarrollaron durante 7 días a 22°C y luego se sometieron a los diferentes tratamientos.

Elección de progenies

Se desarrollaron plantas a partir de semillas durante 35 días en condiciones de invernadero como se describió en el párrafo anterior, posteriormente se transfirieron grupos de 6 plantas por progenie a una cámara de crecimiento a 38/24° C día/noche y fotoperiodo de 12 h, se aplicaron dos riegos diarios y la fertilización se mantuvo sin cambio; otros grupos del mismo número de plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero. La elección se hizo en base al desarrollo de las plantas en ambos regímenes de temperatura, registrando la duración del ciclo de vida, alargamiento del tallo, tiempo para desarrollar estolones y número de tubérculos formados por planta.

Expresión de termotolerancia.

Como una medida de la adquisición de termotolerancia se midió la sobrevivencia de plántulas de 7 días sometidas a pretratamientos térmicos de 22, 28, 32 y 36° C durante 1 y 2 h, luego se incubaron a 40° C (temperatura letal) durante 24 h y finalmente se colocaron en recuperación a 22° C; después de tres días de exposición a esta temperatura se cuantificaron las plántulas sobrevivientes.

Efecto del calcio en la expresión de termotolerancia

Para determinar si el calcio juega algún papel en la adquisición de la termotolerancia se germinaron semillas en agua destilada o en cloruro de calcio 5 mM; después de 7 días de desarrollo a 22° C se les aplicaron tratamientos de

choque térmico, quedando 4 grupos experimentales: desarrollo en presencia de CaCl_2 y aplicación de choque térmico, crecimiento con CaCl_2 sin choque térmico, choque térmico sin CaCl_2 y un último sin CaCl_2 y sin aplicación de choque térmico (control). Todas las plántulas fueron incubadas a 40°C durante tres días. Se tomaron muestras a las 6, 12, 18, 24, 48 y 72 horas para determinar el daño a nivel de membrana por conductimetría, la viabilidad del tejido por reducción de TTC y para detectar los cambios en la expresión de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Permeabilidad de la membrana

El daño a nivel de membrana por efecto del calor se estimó por conductimetría, para ello se suspendieron 0.5 g de tejido cortado en trozos pequeños, en 30 ml de agua desionizada, después se incubaron a 40°C durante 4 h y finalmente se congelaron. El contenido de iones se midió con un analizador PH-EC Meter C731 registrando la conductividad del agua desionizada sin tejido (EC 0), después de la incubación a 40°C (EC 1) y después de la congelación (EC 2). El porcentaje de daño se calculó con la fórmula: $\text{EC1} - \text{EC0} / \text{EC2} - \text{EC0} \times 100$

Viabilidad

La viabilidad de las plántulas se estimó por la prueba colorimétrica de reducción de cloruro de 2,3,5-triclorofenil tetrazolio (TTC). Se incubó 0.1g de tejido en TTC al 0.08% en buffer de fosfatos (pH 7.2), durante 18-20 horas en oscuridad y a temperatura ambiente, previa desgasificación. Para la extracción de

las sales reducidas de TTC (formazán) se lavó el tejido con agua destilada, se agregaron 3 ml de etanol al 95% y se evaporó en baño María; finalmente se agregaron 3 ml de etanol al 95% y se agitó vigorosamente. Se midió la absorbancia de los extractos a 485 nm. El daño se expresó en porcentaje relativo a la absorbancia obtenida con tejido sin tratamiento previo.

Cambios en el contenido de proteínas.

La determinación del efecto en la síntesis de proteínas de los diferentes tejidos se realizó aplicando tratamientos de choque térmico en hojas sumergidas en buffer de fosfatos (pH 7.2), en tubérculos completos y plántulas de 7 días de germinación. Para la extracción de proteínas las muestras se almacenaron a -70°C , se homogeneizó en frío 1g de tejido en 2 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, dodecil sulfato de sodio 2%, metanol 5%, glicerol 5%, fenil metil sulfonil fluoruro 1mM, polivinil pirrolidona insoluble 1% y mercaptoetanol 5 mM), el homogeneizado se centrifugó a 16000 g durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en congelación a -70°C . La concentración total de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (Keleti, 1974). Las muestras se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida por el método de Laemmli (1970); se utilizó un equipo miniprotean II (Bio Rad), con geles al 12 % y cargando 15 μg de proteína por carril. Se aplicó la tinción con nitrato de plata y los geles se secaron al aire entre dos tiras de papel celofán. El patrón de bandas se examinó en un analizador de imágenes (MultiImage Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, San Isidro CA). Las masas moleculares de las proteínas de interés se aproximaron por medio del software de análisis propio del equipo (AlphaEase image processing and analysis system), usando marcadores

de masa molecular SIGMA de amplio y bajo intervalo (6.5 - 205 kDa y 6.5 - 66 kDa respectivamente).

RESULTADOS

Elección de progenies.

Cuando las plantas fueron mantenidas bajo estrés térmico (38/22°C D/N), el ciclo de vida se redujo 7 días en la mayoría de las progenies y 20 días en Chiquita x TS9 (Cuadro 2). El tiempo que tardaron las plantas en desarrollar estolones se prolongó 17 días en TS9 x TPS113 y 18 días en el resto de las progenies. La producción de tubérculos por planta se redujo drásticamente, sobre todo en Chiquita x TS9, puesto que la reducción por efecto del calor fue prácticamente del 100%, en cambio en MFII x TS10 se obtuvo la mayor producción de tubérculos por planta, comparado con lo obtenido a una temperatura no limitante.

Cuadro 2. Efecto del calor sobre el desarrollo de plantas obtenidas de semilla sexual de papa.

PROGENIE	CICLO DE VIDA (Días)		FORMACIÓN DE ESTOLONOS (Días)		TUBERCULOS POR PLANTA	
	22° C	38° C	22° C	38° C	22° C	38° C
MFII x TS9	105	98	73	91	6	1.1
LT8 x TS9	105	98	73	91	9.1	0.6
TS9 x TPS113	105	98	81	98	4.8	1.5
MFII x TS10	105	98	73	91	6.5	2.0
Serrana x TS5	105	98	73	91	7.5	0.3
Chiquita x TS9	105	85	81	99	8.5	0.2

El alargamiento del tallo también se incrementó notablemente en todas las progenies. En las Figuras 2 a 7 se observan las diferencias en crecimiento de cada progenie en condiciones favorables y estresantes de temperatura; en MFII x TS10 (Figura 5) se obtuvo la menor diferencia en el crecimiento a ambas temperaturas, en el resto de las progenies el promedio del tamaño del tallo obtenido en condiciones de calor, fue en promedio 2.5 veces mayor al obtenido en condiciones normales de temperatura.

Figura 2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas obtenidas de SSP de MFII x TS9.

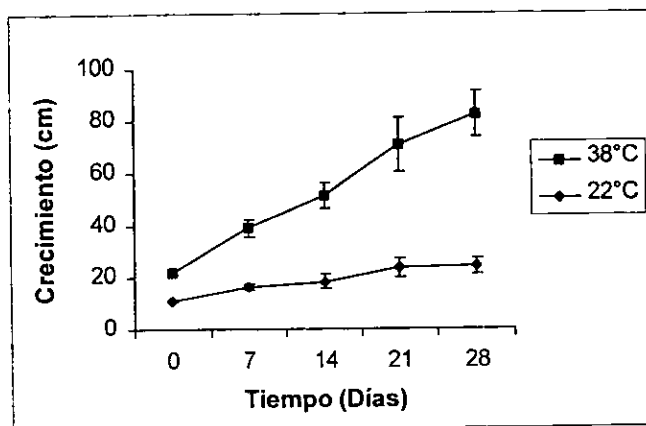


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas obtenidas de SSP de LT8 x TS9.

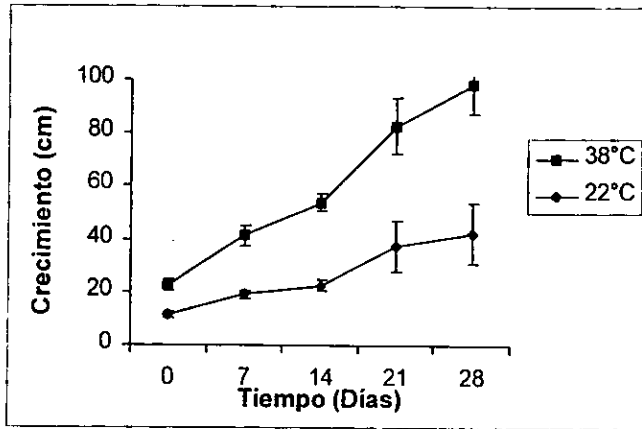


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas obtenidas de SSP de TS9 x TPS113.

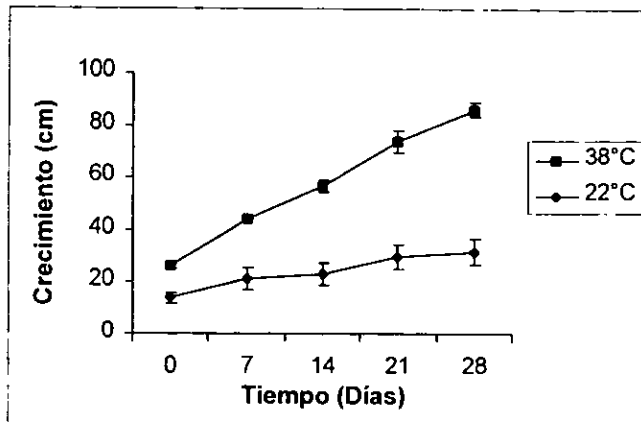


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas obtenidas de SSP de MFII x TS10.

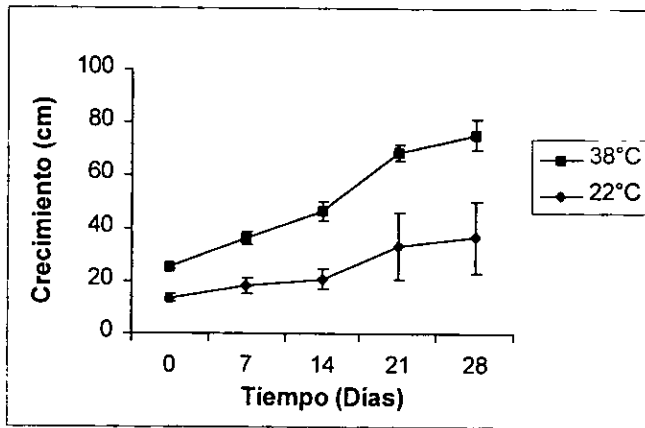


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas obtenidas de SSP de Serrana x TS5.

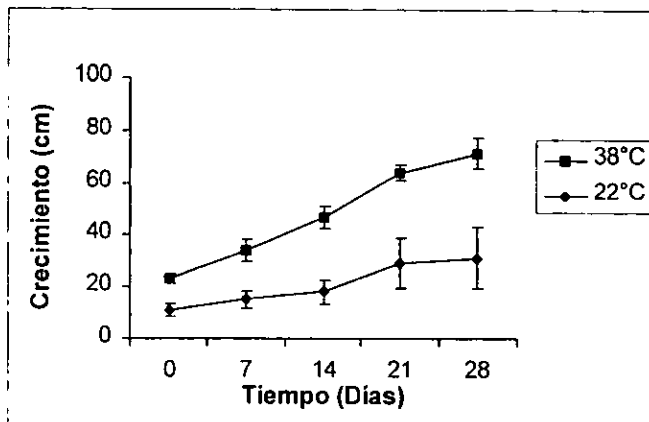
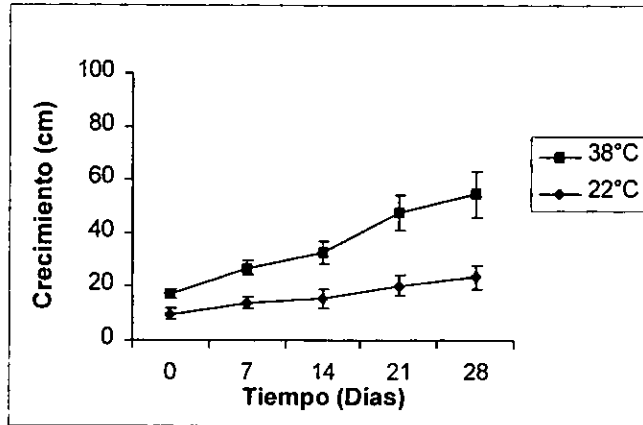
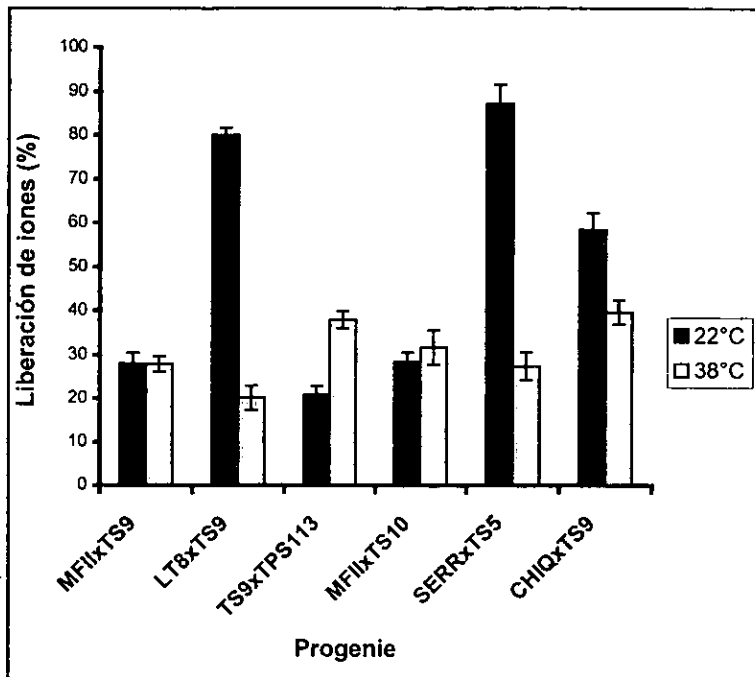


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas obtenidas de SSP de Chiquita x TS9.



La permeabilidad de la membrana también se vió afectada cuando las plantas se desarrollaron en condiciones de calor. La Figura 8 muestra los porcentajes de liberación de iones, determinados por conductimetría, cuando muestras de tejido de hojas de plantas desarrolladas en los dos regímenes de temperatura (normal y estresante) se incubaron por 4 horas a 40°C. Las progenies que mantuvieron aproximadamente los mismos porcentajes de liberación de iones en ambos tratamientos fueron MFII x TS9 (28 %) y MFII x TS10 (30%), mientras que las mayores diferencias causadas por el calor se obtuvieron en Serrana x TS5, LT8 x TS9 y Chiquita x TS9; en éstas se observan porcentajes desde 60 hasta 90% aproximadamente, cuando las plantas crecieron a 22°C; aunque en las plantas de estas progenies desarrolladas en condiciones de calor, los porcentajes de liberación de iones fueron bajos.

Figura 8. Efecto del calor en la permeabilidad de la membrana de plantas (hoja), desarrolladas en dos regímenes de temperatura.

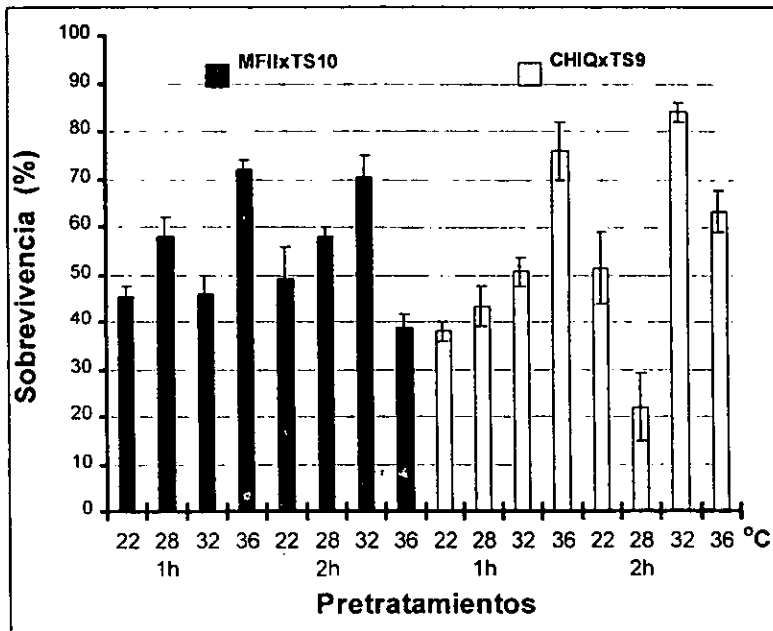


De acuerdo con los resultados anteriores, la progenie que mostró la mayor susceptibilidad al calor fue Chiquita x TS9, puesto que en las plantas de esta progenie se obtuvo el menor rendimiento y un incremento muy marcado en la elongación del tallo, así como la mayor susceptibilidad de la membrana por efecto del estrés térmico. En cambio, MFII x TS10 se obtuvieron resultados opuestos estas características; es decir, estas progenies mostraron caracteres contrastantes.

Expresión de termotolerancia.

Los mayores porcentajes de sobrevivencia en ambas progenies se obtuvieron con los pretratamientos de 2 horas a 32°C ($70 \pm 5\%$ en MFII x TS10 y $85 \pm 2\%$ en Chiquita x TS9), seguidos por el de 1 hora a 36°C ($71 \pm 2\%$ en MFII x TS10 y $76 \pm 6\%$ en Chiquita x TS9), como se muestra en la Figura 9. Por otro lado, los menores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron cuando las plántulas se pretrataron a 28 y 22°C 1 o 2 horas y a 36°C 2 horas en el caso de MFII x TS10. En base a estos resultados se seleccionó la intensidad y duración del choque térmico, con el cual se expresó la mayor termotolerancia para ambas progenies (32°C, 2 horas).

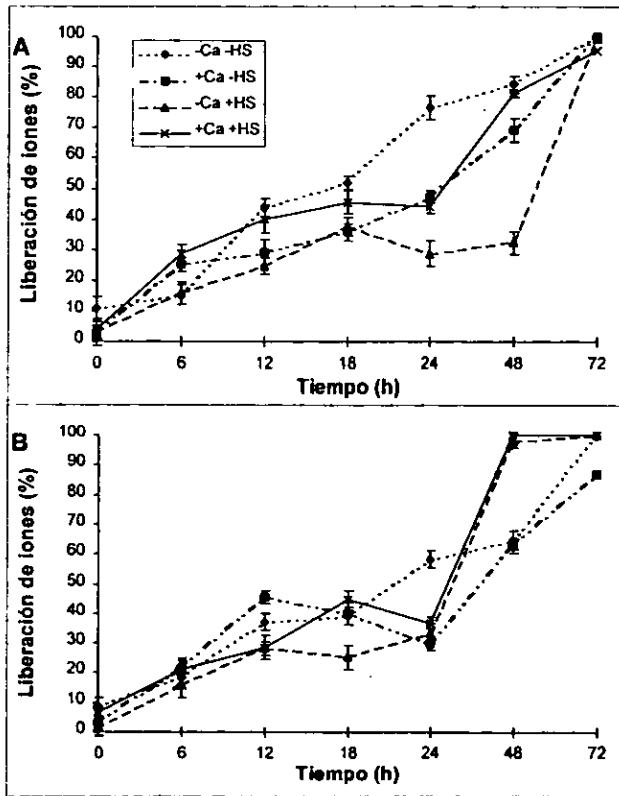
Figura 9. Porcentajes de sobrevivencia de plántulas de 7 días incubadas por 24 horas a 40°C, tratadas previamente 1 y/o 2 horas a diferentes temperaturas.



Efecto del calcio en la expresión de termotolerancia.

En la Figura 10 se muestran los porcentajes de liberación de iones en plántulas de 7 días tratadas con calcio (CaCl_2 5mM) y/o choque térmico (32°C , 2h) y expuestas a 40°C durante 72 h. En comparación con las plántulas control (\blacklozenge), la menor liberación de iones a través de la membrana se observó en Chiquita x TS9 sometida a choque térmico (\blacktriangle), hasta las 48 h; en tanto que en las tratadas con calcio (\blacksquare) y choque térmico más calcio (\times) se obtuvieron valores intermedios. A las 72 h las plántulas de todos los tratamientos llegaron al máximo de liberación de iones. En MFII x TS10 (Figura 10B) hasta las 24 h se observa el mismo efecto, después de este tiempo la liberación de iones fue menor en las plántulas tratadas con calcio (\blacksquare).

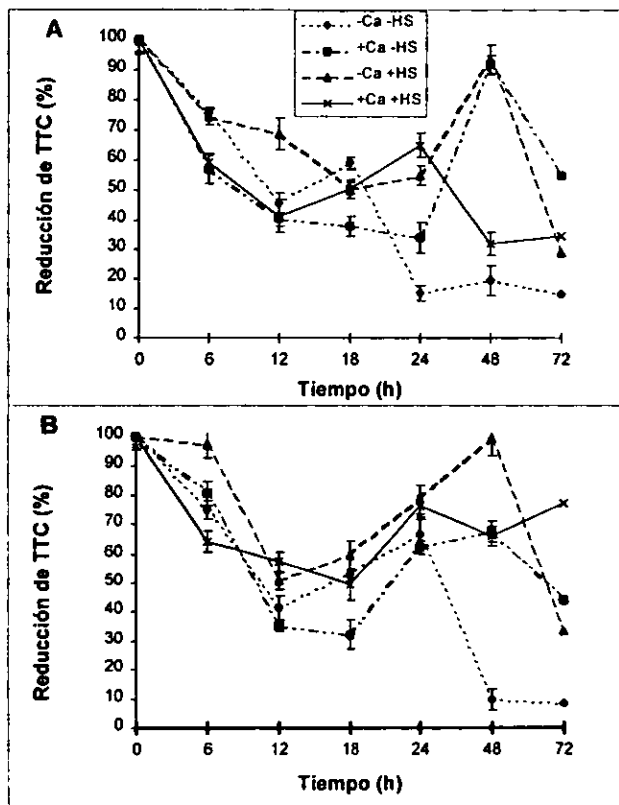
Figura 10. Efecto del calcio y el choque térmico en el porcentaje de liberación de iones de plántulas de SSP incubadas a 40°C durante 72 horas. Chiquita x TS9 (A) y MFII x TS10 (B) .



Por otro lado, los mayores porcentajes de reducción de TTC se observaron en las plántulas de ambas progenies pretratadas con choque térmico (\blacktriangle) hasta las 48 horas (Figura 11); sin embargo, a las 72 h los valores más altos correspondieron a los tratamientos con calcio (\blacksquare). Apparently, at short times calcium alone or combined with thermal shock did not protect the tissue against heat damage,

puesto que los porcentajes de reducción de TTC obtenidos con ambos tratamientos fueron menores que los del control.

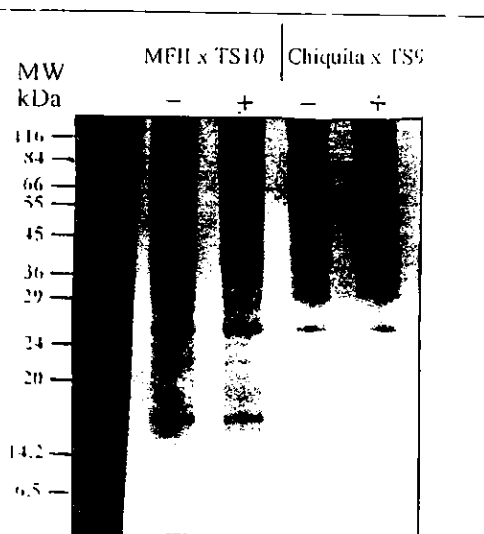
Figura 11. Efecto del calcio y el choque térmico en el porcentaje de reducción de TTC de plántulas de SSP de Chiquita x TS9 (A) y MFII x TS10 (B) incubadas a 40°C durante 72 horas.



Cambios en el contenido de proteínas

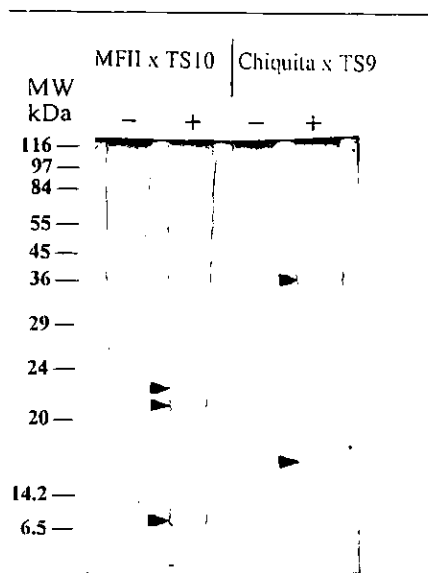
Las plántulas de las dos progenies tratadas con choque térmico (Figura 12 carriles 2 y 4), no mostraron variaciones en el contenido de proteínas con respecto a los controles (carriles 1 y 3). El número y posición de las bandas en los 4 carriles es prácticamente el mismo, es decir, no existen diferencias marcadas entre progenies ni entre tratamientos.

Figura 12. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida de tejido de plántulas tratadas con (+) y sin (-) choque térmico .



En el tejido de hoja de MFII x TS10 (Figura 13) tratado con choque térmico (carril 2), se detectó la aparición de dos polipéptidos de 9 y 20 kDa respectivamente, además del incremento en intensidad de uno de 6 kDa; mientras que en las muestras de hoja de Chiquita x TS9 se detectó el incremento en la intensidad de dos bandas de 9 y 35 kDa por efecto del choque térmico.

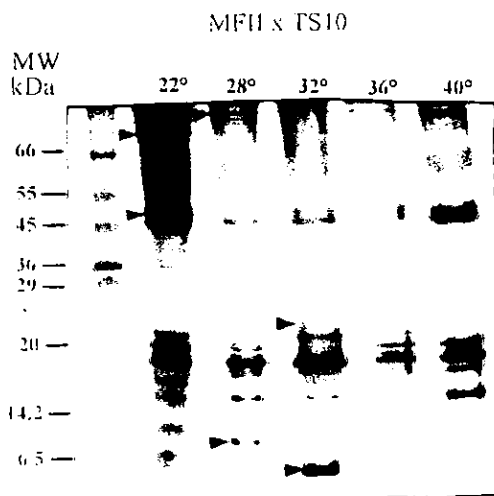
Figura 13. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de tejido de hojas de plantas tratadas con (+) y sin (-) choque térmico.



En la Figura 14 se presentan los patrones de proteínas obtenidos de tejido de tubérculo de MFII x TS10. Cuando los tubérculos fueron incubados a 28°C, se detectó la desaparición de un polipéptido de 70 kDa, el cual estaba presente en el

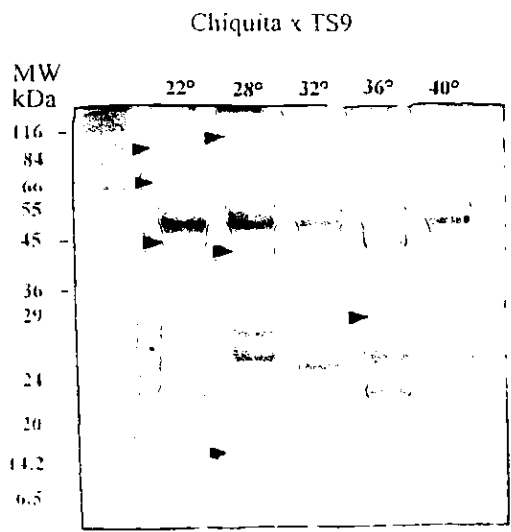
tejido incubado a 22°C (control); también a 28°C aparecieron 2 polipéptidos de 9 y 80 kDa, respectivamente. Por otro lado, con la incubación a 32°C se observó la aparición de dos polipéptidos más de 7.2 y 20 kDa; éste último se mantuvo aunque en menor intensidad a los 36°C. Aunque en esta progenie se observó la disminución en la síntesis de algunas proteínas a las diferentes temperaturas, el número de bandas que aparecen a los 40°C (carril 5) muestra muy pocas diferencias en comparación con el control (carril 1). Finalmente, se observó la disminución en intensidad de una banda, correspondiente a un polipéptido de 44 kDa, conforme se incrementó la temperatura.

Figura 14. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de tejido de tubérculo de MFII x TS10 incubado a diferentes temperaturas .



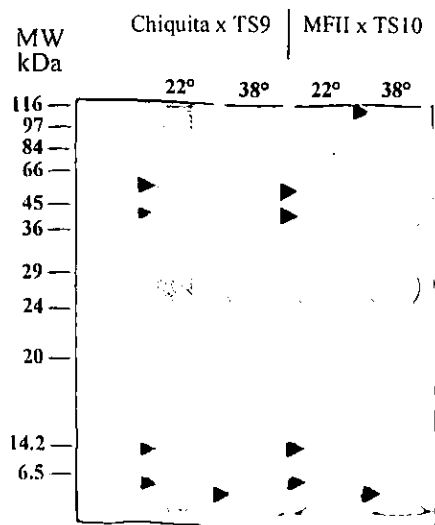
Cuando el tejido de tubérculo de Chiquita x TS9 (Figura 15) fue incubado a 28°C (carril 2), se observó la desaparición de tres polipéptidos presentes en el tejido incubado a 22°C (control), estos polipéptidos corresponden a las masas de 45, 70 y 90 kDa, respectivamente; a esta misma temperatura (28°C) se detectó la aparición de tres polipéptidos de 9, 40 y 98 kDa. La concentración del polipéptido de 9 kDa disminuyó gradualmente conforme se incrementó la temperatura, hasta desaparecer a los 40°C (carril 5). Al incubar el tejido a 36°C (carril 4) se registró la aparición de un nuevo polipéptido de 25 kDa, mientras que se detectó la reaparición de un polipéptido de 90 kDa, el cual estaba presente en el control y ausente en las muestras incubadas a las demás temperaturas. Del mismo modo que en MFII x TS10, en este caso también se observó la disminución en intensidad de una banda correspondiente a un polipéptido de 44 kDa conforme se incrementó la temperatura. En Chiquita x TS9 se observó la disminución paulatina en el número de polipéptidos a medida que se incrementó la temperatura (Figura 15), sobre todo los polipéptidos de baja masa molecular.

Figura 15. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de tejido de tubérculo de Chiquita x TS9 incubado a diferentes temperaturas .



Además de los cambios anteriores, se detectaron varias modificaciones en el contenido de polipéptidos, causadas por la exposición de las plantas al calor permanente. En las muestras de hoja de MFII x TS10 (Figura 16, carril 4), se detectó la aparición de un polipéptido de 116 kDa ausente en el control (carril 3); este polipéptido no se detectó en Chiquita x TS9 (Carril 2). En cambio, en ambas progenies se observó la desaparición de dos polipéptidos, de 66 y 9 kDa, y el incremento en intensidad de 2 bandas correspondientes a polipéptidos de 53 y 7 kDa, respectivamente.

Figura 16. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de tejido de hoja de plantas desarrolladas en condiciones de calor (38/22°C D/N) durante 70 días, .



DISCUSIÓN

Las efectos causados por el calor en papa, como en todos los organismos, están relacionados con las alteraciones en el contenido y funcionamiento de las proteínas sintetizadas en las células; estas alteraciones determinan los cambios morfológicos y fisiológicos que se registran en la planta, como pueden ser el retraso o inhibición de la tuberización, la reducción en el tiempo de vida de las hojas y de las plantas en general, la disminución de las tasas de asimilación del carbono, etc (Chen, op. cit.).

En este trabajo se observó que la reducción en el ciclo de vida de las plantas por efecto de la temperatura fue significativa en todas las progenies, este efecto ha sido reportado para otros clones por Kooman et al. (1996), quienes observaron el acortamiento del ciclo vida de las plantas debido al incremento en la temperatura ambiental en condiciones de campo. El acortamiento del ciclo fue particularmente notorio en la última fase del desarrollo de las plantas, desde el inicio de la tuberización hasta el final del ciclo de vida. La reducción en el tiempo de desarrollo de las plantas afectó directamente el rendimiento, puesto que la fase del ciclo de vida más susceptible es la destinada a la formación y desarrollo de los tubérculos.

Además de la reducción del ciclo de vida, en las plantas desarrolladas en calor permanente, se retrasó la formación de estolones y por lo tanto la tuberización, en comparación con las plantas desarrolladas en condiciones normales. Ambos efectos se suman al bajo rendimiento ocasionado por el incremento en la temperatura en todas las progenies (Cuadro 1); Kooman et al. (1996) obtuvieron resultados similares en plantas de diferentes clones de papa, las cuales desarrollaron a diferentes temperaturas durante todo su ciclo de vida; en

ellas se redujo tanto el número de tubérculos producidos, como la materia seca total y del tubérculo, conforme se incrementó la temperatura.

En diferentes trabajos se ha establecido el efecto del calor en el crecimiento de las plantas de diferentes clones de papa, como una tendencia al incremento en la elongación del tallo, de manera que cuanto más sensible a la temperatura sea el clon, mayor es la tendencia al alargamiento del tallo (Lafta, op. cit., Morpurgo, op. cit., y Benz 1995). La mayoría de las progenies analizadas en este trabajo incrementaron drásticamente su tamaño cuando se desarrollaron en condiciones de calor, sobre todo MFII x TS9 y Chiquita x TS9, mientras que en MFII x TS10 se obtuvieron las menores diferencias (Figuras 2-7). Este resultado concuerda con el hecho de que la alta demanda energética requerida para el alargamiento del tallo se compensa con la producción disminuida de tubérculos.

Una de las alteraciones a nivel celular producida por el estrés térmico, es el cambio en la permeabilidad de la membrana, que conduce al incremento en la liberación de iones (Morpurgo, op. cit.). En el presente trabajo se encontró que MFII x TS10 y MFII x TS9 fueron las progenies termotolerantes, puesto que el daño producido por el incremento en la temperatura (40°C 4h) fue prácticamente el mismo en las plantas que fueron aclimatadas al calor (38°C) que en aquellas cultivadas en condiciones no limitantes de temperatura (22°C), como se observa en la Figura 8. Por el contrario, en las plantas de las progenies LT8 x TS9, Serrana x TS5 y Chiquita x TS9, desarrolladas en condiciones normales (22°C), la alteración en la permeabilidad de la membrana fue muy alta después de incubarlas por 4h a 40°C. Sin embargo, cuando estas mismas progenies se adaptaron al crecimiento a temperatura elevada (38°C), el daño en la membrana causado por el mismo tratamiento fue reducido, lo cual refleja la termosensibilidad de estas tres

progenies. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por Blum et al. (1981) en plantas de trigo expuestas a 44°C durante prácticamente todo su ciclo de desarrollo. Estos autores reportaron que la variedad termosensible Lakhish liberó más electrolitos por incubación a temperaturas crecientes, que la variedad termorresistente Inbar.

De las 6 progenies analizadas la que mostró mayor sensibilidad al calor fue Chiquita x TS9, puesto que ésta mostró las mayores alteraciones por efecto del calor; en cambio la progenie que mostró la mayor termotolerancia fue MFII x TS10, puesto que en ella se registró el menor daño causado por el incremento en la temperatura (Cuadro 1, figuras 2-8). Ambas progenies mostraron fenotipos contrastantes, lo cual las hace buenas candidatas para la búsqueda de marcadores moleculares de termorresistencia o termosensibilidad.

Las plantas tienen la capacidad de expresar cierto grado de termotolerancia cuando son expuestas durante un tiempo corto a una temperatura elevada pero no letal; a este tratamiento se le conoce como choque térmico (Nover, 1989); sin embargo, la intensidad y duración de la temperatura que constituyen el choque térmico es variable entre las especies e incluso entre variedades de la misma especie (Lindquist, op. cit.). Las respuestas al choque térmico también varían entre especies, variedades, tejidos y en las distintas etapas del desarrollo de una planta. La medida más global de la respuesta de una planta al choque térmico es su sobrevivencia después del tratamiento. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 9, ambas progenies expresaron la mayor termotolerancia con los pretratamientos de 36°C y 32°C durante 1 y 2 horas, respectivamente.

Los resultados de liberación de electrolitos y reducción de TTC muestran que

en el caso de Chiquita x TS9, el choque térmico (32°C, 2h) brindó la mayor termotolerancia; sin embargo, aparentemente el calcio también tiene un papel en la inducción de la termotolerancia en esta progenie, puesto que con la aplicación de calcio los valores de liberación de iones (Figura 10 A) y de reducción de TTC (Figura 11 A) fueron menores y mayores que en el control, respectivamente. Los resultados fueron diferentes en MFII x TS10, en esta progenie las plántulas tratadas con choque térmico mostraron la mayor termotolerancia hasta las 24 horas de exposición a la temperatura letal, puesto que el daño en la membrana fue menor que en las plántulas control (Figura 10 B); después de este tiempo y hasta las 72 horas, la mayor termotolerancia se expresó con la adición de calcio. Este efecto termoprotector del calcio y del choque térmico se comprobó con los registros de reducción de TTC (Figura 11 B), en los cuales se observó la inhibición casi total de la actividad enzimática en los controles, mientras que en el resto de los tratamientos se observó la recuperación de las plántulas incubadas a la temperatura letal, sobre todo 24 horas después del choque térmico y a las 72 horas en las plántulas tratadas con calcio (Figura 11).

Con los dos tratamientos (choque térmico y adición de calcio) se indujo la termotolerancia en ambas progenies, sin embargo no se observó sinergia, a diferencia de la reportada por Gong (1997) en plántulas de maíz incubadas a 50°C, las cuales fueron tratadas previamente con calcio (CaCl₂ 20 mM) y/o choque térmico (42°C, 2h); cualquiera de estos tratamientos indujo la termotolerancia por separado prácticamente a los mismos tiempos en maíz, mientras que el efecto se potenció significativamente en las plántulas tratadas con ambos. Estos autores concluyeron que la termotolerancia inducida por choque térmico en maíz requiere la entrada de calcio a la célula.

Los resultados de este trabajo sugieren que el mecanismo de inducción de termotolerancia por choque térmico en papa es distinto al reportado para maíz, puesto que como se mencionó anteriormente no hubo sinergia por la adición de calcio y además, la termotolerancia inducida por choque térmico se manifiesta a tiempos cortos, en tanto que la inducida por calcio ocurre a tiempos tardíos.

Uno de los efectos principales del calor en las plantas es la alteración en la síntesis de proteínas, la cual varía entre especies, variedades, tejidos y según la edad de las plantas. Los patrones electroforéticos de las plántulas de MFII x TS10 fueron diferentes a los de Chiquita x TS9. Sin embargo; a diferencia de lo esperado, el choque térmico no alteró el patrón electroforético de ninguna de las progenies (Figura 12), lo que sugiere que en esta etapa de desarrollo de la plántula no hay efecto del choque térmico sobre la síntesis de proteínas. Este resultado contrasta con las alteraciones causadas por el choque térmico en los patrones electroforéticos reportados para plántulas de sorgo (Howarth y Scot, 1994) y soya (Lin op. cit.), en las que disminuye la síntesis de los polipéptidos normales y se sintetizan varias HSPs.

Por el contrario, en tejido de plantas maduras se detectaron diferencias causadas por el choque térmico. En la Figura 13 se muestran los perfiles de proteínas de hojas de ambas progenies tratadas con choque térmico (carriles 2 y 4). En MFII x TS10 destaca la aparición de dos polipéptidos cuyas masas moleculares (6 y 16 kDa) permiten agruparlos en la familia de las smHSPs. Puesto que estos dos polipéptidos se presentan sólo en la progenie termotolerante y no en Chiquita x TS9 (termosensible), podrían considerarse como marcadores bioquímicos de termotolerancia. Las smHSPs se encuentran ampliamente distribuidas en los vegetales y su síntesis se induce durante varios procesos normales (germinación,

maduración del fruto, embriogénesis somática, desarrollo del polen), así como por varios tipos de estrés (sequía, frío, iluminación, daño mecánico, etc.) además del choque térmico (Waters, op. cit.).

Por el contrario, en hojas de Chiquita x TS9 no se detectó la aparición de ningún polipéptido nuevo por efecto del choque térmico, solamente se incrementó la concentración de dos preexistentes de 9 y 35 kDa, respectivamente.

Como una respuesta al choque térmico, los tubérculos de MFII x TS10 produjeron 4 polipéptidos nuevos, dos aparecieron a 28°C (80 kDa y 9kDa) y los otros a 32°C (7.2 kDa y 20 kDa) (Figura 14). Los tres polipéptidos pequeños pueden agruparse en la familia de las smHSPs, al igual que los polipéptidos encontrados en el tejido de hoja de esta misma progenie. La aparición del polipéptido de 80 kDa concuerda con los datos reportados para células eucariontes animales, cuyas proteínas de choque térmico más abundantes se encuentran en un intervalo de 80 a 90 kDa (Lindquist, ob. cit.).

En tubérculos de Chiquita x TS9 incubados a 28°C se detectó la aparición de tres polipéptidos a 28°C (9kDa, 41kDa y 98 kDa), en tanto que por incubación a 36°C apareció un polipéptido de 25 kDa (Figura 15). De éstos, sólo los polipéptidos de 9 y 25 kDa pueden agruparse en la familia de las smHSPs, puesto que las masas moleculares de los otros no permiten agruparlos en ninguna de las familias de las HSPs descritas.

La exposición prolongada de plantas a 38°C provocó cambios comunes en los patrones electroforéticos de los polipéptidos de ambas progenies: desaparición de dos polipéptidos (9 y 66 kDa) e incremento en las concentraciones de otros dos

(7 y 53 kDa). La diferencia a este nivel entre las dos progenies fue la aparición de un polipéptido de 116 kDa solamente en MFII x TS10 (Figura 16). La aparición de este polipéptido de alta masa molecular en la progenie termotolerante y su ausencia en la termosensible sugiere que éste es un marcador bioquímico de termotolerancia.

Adicionalmente, los resultados sugieren que la expresión de la termotolerancia está regulada de alguna manera por el desarrollo de las plantas, ya que sólo se detectaron variaciones en el contenido de polipéptidos en los tejidos maduros de la planta y no en los primeros estadios de desarrollo de ésta.

La respuesta al calor es un fenómeno muy complejo en el cual participan un gran número de proteínas, cuyas funciones específicas no han sido completamente dilucidadas. En este trabajo se detectó la variación en la composición de polipéptidos por efecto del calor, estos cambios se manifestaron como el incremento o la disminución en la concentración así como la desaparición de algunos polipéptidos, cuando los tejidos fueron expuestos a un incremento en la temperatura. Un aspecto muy importante fue la aparición de varios polipéptidos como respuesta al estrés térmico, algunos de los cuales son buenos candidatos a utilizarse como marcadores bioquímicos de termotolerancia; estos marcadores pueden permitir el rápido reconocimiento de variedades capaces de desarrollarse en climas cálidos, ya que de manera tradicional la detección de estas variedades requiere de la evaluación del desarrollo durante varios ciclos de cultivo.

Un aspecto adicional muy importante es el uso de semilla sexual para la propagación de la papa, puesto que presenta una serie de ventajas en comparación con el uso de semilla tubérculo, como su calidad sanitaria, debida a la imposibilidad anatómica de que los patógenos comunes que infectan al tubérculo

logren infectar al embrión, el abatimiento de los costos por hectárea sembrada y la simplificación del manejo postcosecha, almacenamiento y transporte.

BIBLIOGRAFÍA

Baoy, W. 1982. Effects of temperature on the germination of true potato seed. *Scientia Horticultural. Sinica.* **3**:28-31.

Benz, J.S., Keller, E.R. and Midmore, D.J. 1995. Planting materials for warm tropic potato production: growth and yield of transplanted seedlings or rooted cuttings and tuber materials in the field. *Field Crops Research.* **40**: 179-192.

Blum, A. and Ebercon, A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science.* **21**: 43-47.

Chen, H.H., Shen, Z.Y. and Li, P.H. 1982. Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Science.* **22**: 719-725.

Desborough, S.L. 1985. Potato proteins. In Potato Physiology. Ed. Paul H. Li. Accademic Press. USA 333-347.

DiDomenico, B.J., Bugaiski, G.E. and Lindquist, S. 1982. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell.* **31**: 593-603

Escobar, V. and Vander Zaag, P. 1988. Field performance of potato (*Solanum* spp.) cuttings in the warm tropics: influence of planting system, hilling, density and pruning. *Rivista di agricoltura Subtropicale e Tropicale.* **65**: 1-10.

Garbarino, E.J., Rockhold, R.D. and Belknap, R.W. 1992. Expression of the stress-

responsive ubiquitin genes in potato tubers. *Plant Molecular Biology*. 20: 135-144.

Gong, M., Li, Y.J., Dai, X., Tian, M. and Li, Z.G. 1997. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 150: 615-621.

Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E. and Dudits, D. 1991. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*. 16:999-1007.

Hahn, M.G. and Li, C.G. 1990. Thermotolerance, thermoresistance, and thermosensitization. In Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 79-100.

Havaux, M. 1995. Temperature sensitivity of the photochemical function of photosynthesis in potato (*Solanum tuberosum*) and a cultivated andean hybrid (*Solanum x juzepczukii*). *Journal of Plant Physiology*. 146: 47-53.

Hawkes, J.G. 1967. The history of potato. Masters Memorial Lecture. 1966. *Journal of Royal Horticultural Society*. 92: 207-224.

Hawkes, J.G. 1990. The potato. Evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press. London.

Hightower, E.L. 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*. 66: 191-197.

Howarth, C.J. and Scot, K.P. 1994. Detailed characterization of heat shock protein

synthesis and induced thermotolerance in seedlings of *Sorghum bicolor* L. *Journal of Experimental Botany*. **45**:1353-1363.

Krauss, A. and Marschener, H. 1984. Growth rate and carbohydrate metabolism of potato tubers exposed to high temperature. *Potato Research*. **27**: 297-303.

Keleti, G. and Lederer, W.H. 1974. *Handbook of micromethods for the biological sciences*. Van Nostrand Reinhold. New York, USA. 89-91.

Klein, J.D. and Ferguson, I.B. 1987. Effect of high temperature on calcium uptake by suspension-cultured pear fruit cells. *Plant Physiology*. **84**: 153-156.

Kooman, P.L., Fahem, L., Tegera, P. and Haverkort, A.J. 1996. Effects of climate on different potato genotypes. 1. Dry matter allocation and duration of the growth cycle. *European Journal of Agronomy*. **5**(3-4): 207-217.

Kooman, P.L., Fahem, L., Tegera, P. and Haverkort, A.J. 1996. Effects of climate on different potato genotypes. 2. Radiation interception, total and tuber dry matter production. *European Journal of Agronomy*. **5**(3-4): 193-205.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

Lafta, A.M. and Lorenzen, J.H. 1995. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiology*. **109**: 637-643.

Levi, D. 1986. Tuber yield and tuber quality of several potato cultivars as affected

by seasonal high temperatures and by water deficit in a semi-arid environment. *Potato Research*. **29**: 95-107.

Lin, C.Y., Roberts, J.K. and Key, J.L. 1984. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiology* **74**:152-160.

Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*. **55**: 1151-1191.

Maldonado, A.U. 1982. Papa, alimento base del pueblo mexicano. Folleto informativo. INIFAP. México.

Menzel, C.M. 1980. Tuberization in potato at high temperatures: responses to gibberelins and growth inhibitors. *Annalytical Botany*. **46**: 259-265.

Midmore, D.J. and Prange, R.K. 1991. Sources of heat tolerance amongst potato cultivars, breeding lines, and *Solanum* species. *Euphytica*. **55**: 235-245.

Morpurgo, R. 1986. In search of physiological traits useful as screening methods for heat tolerance. *Rivista di agricoltura Subtropicale e Tropicale*. **4**: 549-563.

Mosser, D.D., Kotzbauer, P.T., Sarge, D.K. and Morimito, R.I. 1990. In vitro activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proceeding of the National Academy of Science. USA*. 3748-3752.

Nover, L.D. and Scharf, K.D. 1989. Heat shock and other stress response systems

of plants. Springer-Verlag, Berlin. 233- 251.

Ougham, J.H. and Howarth, J.C. 1988. Temperature shock proteins in plants. In plants and temperature symposia of the society for experimental biology. The Company of Biologist Limited. USA. Vol. 42, 259-262

Page, O.T. 1982. Utilization of the genetic resources of the potato III. International Potato Center, Lima, Perú. 235p.

Porter, C.L. 1967. Taxonomy of the flowering plants. 2a ed. W.H. Freeman and Co. USA. 402

Purseglove, J.W. 1987. Tropical crops: Dicotyledons. Longman Scientific & Technical. 560-563.

Rickey, M.T. and Belknap, W.R. 1991. Comparisson of the expression of several stress responsive genes in potato tubers. *Plant Molecular Biology*. **16**(6):1009-1018.

Ross, H. 1986. Potato breeding -- problems and perspectives: Advances in plant breeding . Paul Parey, Berlin and Hamburg. 132.

Sarquís, J.I., González, H. and Bernal-Lugo, I. 1996. Response of two potato clones (*S. tuberosum* L.) to contrasting temperature regimes in the field. *American Potato Journal*. **73**(7): 285-300.

Sattelmacher, B. 1993. A rapid seedling test for adaptation to high temperatures.

Potato Research. 26: 133:138.

Steponkus, P.L. and Lanphear, F.O. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiology*. 42: 1423-1426.

Ugent, D., Dillehay, T. and Ramírez C. 1987. Potato remains from a late Pleistocene settlement in south central Chile . *Economy Botanica*. 4(1): 17-27

Vander Zaag, D.E. and Horton, D. 1983. Potato production and utilization in world perspective with special reference to the tropics and subtropics. *Potato Research*. 26:323-362.

Waters, R.E., Garret, J.L. and Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*. 47: 325-338.

Wehmeyer, N., Hernandez, D.L., Finkelstein, R.R. and Vierling, E. 1996. Synthesis of small heat shock proteins in part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology*. 112: 747-757.

Wolf, S., Olenski, A., Rudich, J and Marani, A. 1990. Effect of high temperature on photosynthesis in potatoes. *Annalytical Botany*. 65:179-185