

Respuesta de cultivares nativos de papa (*Solanum tuberosum* L.) al estrés hídrico por sequía

Gabriel J.¹; S. Veramendi²; A. Angulo¹; J. Magne¹

Resumen

Con el objetivo de evaluar la respuesta al estrés hídrico por sequía en siete cultivares nativos de papa, se evaluó la actividad enzimática de la Catalasa (CAT), el Ascorbato peroxidasa (APX) y la guaiacol peroxidasa (POX). Los resultados mostraron que los cultivares Imilla lunku, Pinta boca y Waychu qoyllu fueron resistentes y/o tolerantes a la sequía y bajo estas condiciones mostraron valores superiores en la actividad enzimática de la CAT, APX y POX, que sus propios controles. Esto confirmó que estos cultivares fueran resistentes y/o tolerantes a sequía. En cambio, los cultivares Waych'a, Candelero y Sakampaya, fueron susceptibles y tuvieron valores más bajos que sus controles. Sin embargo, el cultivar Sakampaya con 20 días de sequía contrariamente a lo que se esperaba, mostró un valor alto para APX de actividad enzimática, respecto a su control. Esto indica, que el cultivar Sakampaya probablemente tiene otros mecanismos de resistencia y/o tolerancia a la sequía, que le permite reaccionar a estreses más drásticos de sequía. Por último, la permeabilidad cuticular mostró que los cultivares Waychu qoyllu y Pinta boca mostraron altos contenidos de clorofila en comparación a los otros cultivares. Indicando esto, que los cultivares resistentes y/o tolerantes a sequía tuvieron un mayor contenido de clorofila que los cultivares susceptibles.

¹ Programa de mejoramiento genético de cultivos, Fundación PROINPA, Casilla 4285, Cochabamba, Bolivia.
E-mail: j.gabriel@proinpa.org.

² Laboratorio de biología molecular y bioinformática, Fundación PROINPA, Casilla 4285, Cochabamba, Bolivia.

Palabras claves adicionales: *Enzimas antioxidantes, actividad enzimática, clorofila, resistencia, tolerante, severidad.*

Aceptado para publicación: 31 de marzo, 2013

Response of Potato Landraces (*Solanum tuberosum* L.) to Water Stress by Drought

Summary

In order to evaluate the response to water stress by drought in seven potato landraces, we assessed the enzymatic activity of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (POX). The results showed that the Imilla lunku, Pinta boca and Waychu qoyllu landraces were resistant and/or tolerant to drought and showed higher values in the enzymatic activity of CAT, APX and POX, that their own controls. This confirmed that these cultivars were resistant to drought. In contrast, Waych'a, Candelero and Sakampaya cultivars were susceptible and showed lower values of these enzyme activities than their controls. However, Sakampaya cultivar with 20 days of drought contrary to what was expected, showed high levels of APX enzyme activity compared to control. This suggested that this cultivar probably had other mechanisms of resistance and/or tolerance to drought that allowed more dramatic reaction to drought stress. Finally, the cuticle permeability showed that the Waychu qoyllu and Pinta boca cultivars, high chlorophyll content compared to other cultivars. This indicated that the resistant and/or tolerant cultivars for drought had higher chlorophyll content than susceptible cultivars.

Additional key words: *Antioxidant enzymes, enzyme activity, chlorophyll, resistance, tolerance, severity.*

Introducción

El cultivo de papa es conocido por su sensibilidad a la sequía y su efecto en la productividad depende de la intensidad, duración y etapa fenológica en la que se presenta así como de la estrategia inherente del genotipo (Charco, 2002).

La resistencia y/o tolerancia a la sequía de un cultivo hace referencia a su capacidad para crecer satisfactoriamente en zonas con déficit hídrico. Las modificaciones que tienen lugar en la estructura y función de las plantas para aumentar la probabilidad de sobrevivir y reproducirse en un ambiente determinado se llama adaptación (Charco, 2002). Las respuestas adaptativas al estrés por sequía pueden clasificarse en: a) El control de la homeostasis, que incluye la homeostasis iónica y la osmótica, b) El control del daño y la reparación o detoxificación, c) El control del crecimiento. Estos mecanismos actúan conjuntamente ya que la señal de homeostasis regula negativamente la respuesta de detoxificación; entonces, ambas respuestas inducen a la tolerancia al estrés, el cual regula negativamente la inhibición del crecimiento provocada por la aparición de las condiciones ambientales adversas. El segundo mecanismo, repara la alteración del equilibrio entre las especies peroxidantes y los antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1991). Esta alteración bioquímica se manifiesta como un incremento en la tasa de producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), también llamadas especies activas de oxígeno (EAO) son resultado de la reducción parcial del O_2 atmosférico. Existen básicamente cuatro formas de ERO celular a saber: Oxígeno molecular singlete (1O_2), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$), cada uno con la característica vida media. Las ERO pueden ser extremadamente reactivas, especialmente el oxígeno molecular singlete y el radical hidroxilo y a diferencia del oxígeno atmosférico pueden oxidar múltiples componentes celulares como proteínas y lípidos, ADN y ARN. Las ERO se producen continuamente en el cloroplasto, mitocondria y peroxisomas

En condiciones normales, la producción y remoción de las ERO está estrictamente controlada. Sin embargo, el equilibrio entre la producción y la depuración de éstas puede ser perturbado por diversos factores fisicoquímicos, como son el déficit hídrico, la salinidad, las temperaturas extremas, la excesiva o insuficiente radiación luminosa, la anaerobiosis por encharcamiento o inundación, los factores mecánicos como el viento o la compactación del suelo, viento fuerte y las lesiones (Mano, 2002; Cabrera, 2006). Un aumento de la producción o una disminución en los mecanismos de defensa, hace que se pierda el balance entre la aparición de especies nocivas y la capacidad de la célula de evitar su acumulación, ocurre una situación conocida como estrés oxidativo. En estas condiciones las especies activas del oxígeno reaccionan con las macromoléculas de las células modificando su estructura y su función y dando lugar a alteraciones que pueden conducir a la muerte celular.

En el caso de déficit hídrico por sequía, si este es prolongado en el tiempo, esto ocasionará inevitablemente daño oxidativo debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, el incremento en la capacidad de eliminación de estas ERO por parte de la planta es considerada como síntoma de resistencia y/o tolerancia, mientras que la ausencia de respuesta o una disminución respecto de los valores control se considera síntoma de sensibilidad (Hernández y Jimenez, 2000; Toumi *et al.*, 2010).

El mantenimiento de las ERO a un nivel compatible con el funcionamiento celular normal se lleva a cabo por diversas actividades con capacidad antioxidante y que se clasifican en enzimáticas y no enzimáticas (Foyer *et al.*, 1994; Perl y Perl, 2002).

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato oxidable, inhibe o disminuye significativamente la oxidación de este sustrato. Las ERO que se llegan a producir en las células son eliminadas por varios sistemas antioxidantes que se clasifican

como sistema antioxidante enzimático y no enzimático (Perl y Perl, 2002).

Entre los antioxidantes enzimáticos se tiene a la Catalasa (CAT) que elimina H_2O_2 en los peroxisomas, superóxido dismutasa (SOD) que elimina el anion-radical superóxido, Ascorbato peroxidasa (APX) que elimina H_2O_2 en diversos compartimentos y el guaiacol peroxidasa (POX) (Moller *et al.*, 2007).

Otras enzimas de este grupo que desempeñan un papel importante en la detoxificación celular son: la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Arora *et al.*, 2002). Entre los Antioxidantes no enzimáticos, se tiene a los antioxidantes liposoluble como los carotenoides y alfa tocoferol y a los hidrosolubles como el acido ascórbico y glutatión.

Desde el punto de vista agrícola, las posibles soluciones frente a la sequía pasan por la modernización de los sistemas de regadío y por la utilización de cultivos con pocas necesidades hídricas. Por ello, numerosos proyectos de investigación a nivel mundial están orientados a la obtención de variedades que sean capaces de resistir y/o tolerar mejor las condiciones adversas de falta de agua (Parry *et al.*, 2005).

La Superóxido dismutasa (SOD) es la enzima que encabeza en el ataque a las ERO debido a que remueve rápidamente uno de las primeras ERO en ser producidas: el superóxido. La SOD dismuta el superóxido en oxígeno y H_2O_2 . Sin embargo, esta reacción solo convierte una ERO en otra y el H_2O_2 también debe ser destruido. Es aquí donde intervienen enzimas como la CAT y la APX. La CAT es una enzima que contiene hierro en su estructura y cataliza la dismutación del H_2O_2 en agua y oxígeno molecular (Arora *et al.*, 2002). Esta enzima se encuentra en todos los organismos eucariota aeróbicos y constituye un mecanismo esencial para la eliminación del H_2O_2 generado en los peroxisomas por oxidasas que participan en la β -oxidación de ácidos grasos, la fotorespiración y el catabolismo de las purinas. La CAT fue una de las primeras enzimas en ser aislada y obtenida con un alto grado de pureza.

Todas las formas enzimáticas de la CAT son tetraméricas con pesos moleculares de aproximadamente 220 KDa. Múltiples formas de la CAT han sido descritas en numerosas plantas. Estas formas han sido clonadas principalmente de maíz (Terán y Singh, 2002).

Por otra parte, se han encontrado evidencias de que las ERO también funcionan como señales moleculares que median respuestas a varios estímulos (Desikan *et al.*, 2004).

Entre las especies reactivas del oxígeno, el H_2O_2 parece ser que desempeña el papel más importante en la señalización de los cambios estresantes, debido a su elevada estabilidad y largo tiempo de vida media (Hung *et al.*, 2005). Si el H_2O_2 sirve como señal al estrés, las fluctuaciones de H_2O_2 en plantas podrían reflejar cambios espaciales y temporales en el ambiente (Hung *et al.*, 2005). En apoyo a esta idea, un aumento brusco del estado oxidativo es una respuesta común a estreses abióticos y bióticos (Desikan *et al.*, 2003). Estos estreses incluyen patógenos, elicitores, daños mecánicos en el vegetal, calor, bajas temperaturas, luz UV y ozono. Por ejemplo, en invierno el descenso hasta 4°C causó en las hojas de *Triticum aestivum* un aumento en los niveles de H_2O_2 de tres veces en comparación con el control durante un minuto de ensayo (Desikan *et al.*, 2003).

Sobre la base de lo anteriormente mencionado, la presente investigación tuvo el objetivo de evaluar la respuesta antioxidante a la sequía en cultivares nativos de papa.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para la evaluación de la actividad enzimática se utilizaron ocho cultivares nativos de papa las mismas que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cultivares evaluados por su reacción al estrés hídrico por sequía. Año 2012

Cultivar	Especie	Ploidía	Procedencia
Pinta boca	<i>stn</i>	2n=2x=24	Candelaria
Waychu qoyllu	<i>stn</i>	2n=2x=24	Norte Potosí
Candelerero	<i>stn</i>	2n=2x=24	Candelaria
Sakampaya	<i>adg</i>	2n=4x=48	Norte Potosí
Imilla lunku	<i>adg</i>	2n=4x=48	Norte Potosí
Yana ajanhuiri	<i>ajh</i>	2n=2x=24	Norte Potosí
Waych'a	<i>adg</i>	2n=4x=48	Cochabamba

Especies: *stn* - *Solanum stenotomum*, *ajh* - *S.x ajanhuiri*, *adg* - *S. andigena*
 Fuentes: Iriarte *et al.* (2009), Terrazas *et al.* (2008)

Condiciones del experimento

El experimento se implementó en un invernadero de la Fundación PROINPA, ubicada a 13 km en la zona del Paso de la provincia Quillacollo en Cochabamba, a 17° 21' 01.91" de latitud sud y 66° 15' 44.34" de longitud Oeste, con una altura de 2.613 m.s.n.m., una precipitación media anual de 512 mm y una temperatura promedio de 17.4°C.

Los tratamientos fueron la combinación de dos factores: 1) Siete cultivares de papa y 2) Tres niveles de estrés hídrico por sequía: T1: Sin sequía, T2: 10 días de sequía (sin riego) y 20 días de sequía (sin riego). Estos tratamientos se iniciaron a los 79 días después de la siembra (dds) (Mamani, 2000). El experimento se implementó en un diseño de bloques completos al azar en arreglo de parcelas divididas con tres repeticiones (Martinez-Garza, 1998). Cada unidad experimental tuvo cuatro macetas con una planta/maceta. Las macetas fueron de 1 kg de capacidad. Se uso sustrato estéril con chala de arroz, arena lama y tierra vegetal en una proporción 1:1:1 Los riegos fueron realizados con una probeta graduada, utilizándose ½ L de agua/maceta. La variable de respuesta fue la marchitez o severidad (S), evaluada a través de a escala de Blum (1993) modificada por Angulo *et al.* (2009).

Toma de muestras

Para el experimento en laboratorio, se tomó una muestra de cada cultivar y se hizo la lectura por triplicado para la cuantificación enzimática. La colecta se realizó en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico por sequía a los 10 y 20 días (tratamiento) y en hojas de plantas no estresadas (control). Posteriormente se conservaron las muestras a -80°C hasta su análisis.

Preparación de los extractos enzimáticos

El material colectado fue triturado y congelado en nitrógeno líquido, el buffer de extracción enzimático se preparó según la metodología de Frary *et al.* (2010). Se utilizó 100mM de tampón fosfato de potasio a pH 7,0 conteniendo 0,1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP), 1 mM de EDTA, 1 mM de ácido ascórbico. Los extractos se centrifugaron a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes se retiraron a otro tubo para las determinaciones de la CAT, APX y POX.

Para determinar la actividad de la enzima CAT. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 100 mM tampón fosfato de potasio (pH 6,5), 1,0 mM EDTA, 60,0 mM H_2O_2 (Aebi, 1983). La actividad se determinó siguiendo la descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 240 nm en un espectrofotómetro espectrofotómetro (SmartSpec Plus Marca Biorad – USA).

La APX se cuantificó utilizando el método descrito por Nakano y Asada (1987). La mezcla contenía 90 mM de tampón fosfato de potasio (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 0,65 mM ascorbato, y 1,0 mM H_2O_2 . La actividad se determinó siguiendo la descomposición de H_2O_2 dependiente de ascorbato a 290 nm. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus Marca Biorad – USA).

Para determinar el POX se preparó una mezcla de reacción conteniendo 100 mM tampón fosfato de potasio (pH 6,5), 1,0 mM EDTA, guaiacol, y 50% (3 volúmenes) H_2O_2 , (Aebi, 1983). La actividad se determinó siguiendo la descomposición de H_2O_2 , utilizando guaiacol como agente donador de hidrógeno a 470 nm.

El cálculo de la actividad de las enzimas antioxidantes fue realizado mediante la fórmula: CAT, APX, POX activity (Unit) = $(\Delta\text{abs}/\text{min} \times \text{reaction volumen})/0,001$ (Arora *et al.*, 2002)

Permeabilidad cuticular

La permeabilidad cuticular fue medida en base a extracción de clorofila, de acuerdo a la metodología descrita por Zhang *et al.* (2005) y Kosma *et al.* (2009). Las plantas fueron aclimatadas por un periodo de 3 horas en oscuridad (se cubrieron con bolsas negras para disminuir la fotosíntesis), antes de la primera lectura en el espectrofotómetro. Luego se colectó una hoja, de la misma posición para todas las plantas en estudio y se sumergió en tubos de ensayo de 50 mL de capacidad con 15 mL de etanol 80% (v/v). Los tubos fueron agitados a 30 rpm en un agitador orbital 300 (Marca Labnet – USA) y en la oscuridad. Fueron tomadas alícuotas de 200 μL de cada tubo para medir la clorofila, a 647 y 664 nm, a intervalos de 1 hora durante 6 h y posteriormente a las 24 horas. Los datos fueron expresados como porcentaje del total de clorofila extraída a las 24 h en etanol 80% (v/v) (Zhang *et al.*, 2005; Kosma *et al.*, 2009).

Análisis estadístico

Los datos de la variable severidad o marchitez que satisfizo o se aproximó a los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, se analizó de acuerdo al modelo estadístico planteado (Martínez-Garza, 1998). Sobre la base del modelo definido se realizó un análisis de varianza para probar hipótesis de los efectos fijos y comparaciones de medias mediante contrastes de un grado de libertad para determinar las variedades más resistentes. El análisis de varianza también sirvió para estimar los componentes de varianza para los efectos aleatorios. Los análisis indicados se realizaron utilizando el Proc GLM del SAS (SAS, 2004).

Para el análisis estadístico de comparación entre el tratamiento y el control de la actividad enzimática se hizo una prueba de T-test solamente con los cuatro cultivares que fueron sometidos a 10 y 20 días de sequía. Los cultivares que sólo fueron sometidos a 10 días de sequía no fueron considerados para este análisis.

Resultados

Análisis de la resistencia al estrés hídrico

La estimación de los componentes de varianza para la variable severidad (Tabla 2) mostró variación ($\sigma^2_{\text{blq} \times \text{seq}} = 0.001$) en las unidades experimentales o respuestas de los diferentes cultivares entre las parcelas principales dentro de cada tratamiento de sequía, esto significa que el diseño de parcelas principales fue el apropiado para controlar dicha variación.

Asimismo, se observó que existieron diferencias significativas entre los efectos de las tres diferentes sequías sobre los diferentes cultivares ($\text{Pr} < 0,01$).

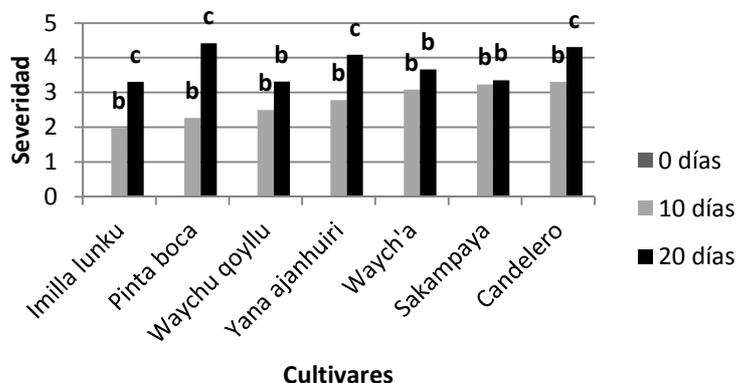
Tabla 2. Componentes de varianza del grado de severidad para siete cultivares nativos de papa, sometidas a tres niveles de sequía. Año 2012

F.V.	GI	C.M. (S)
Total	197	
Bloque	2	0.02**
Sequía	2	2018.62**
Cultivar	6	0.01**
Bloque*Sequía	4	0.02**
Sequía*Cultivar	30	0.01**
Error	171	0.002
C.V.		4.19
R ²		0.97

Leyendas: ** - Diferencias significativas a $\text{Pr} < 0.01$, (S) - Severidad o marchites.

Siendo que la sequía de 20 días causó mayor severidad de marchitez del follaje (3,64) que la sequía de 10 días (2,61) y esta última causó mayor severidad de marchitez de follaje que el testigo (0), se podría aseverar que a mayor duración de la sequía mayor fue el efecto de la severidad de la marchitez del follaje en los ocho cultivares (Figura 1).

Figura 1. Grado de severidad para tres diferentes niveles de estrés hídrico por sequía aplicados en ocho cultivares nativos de papa. Año 2012

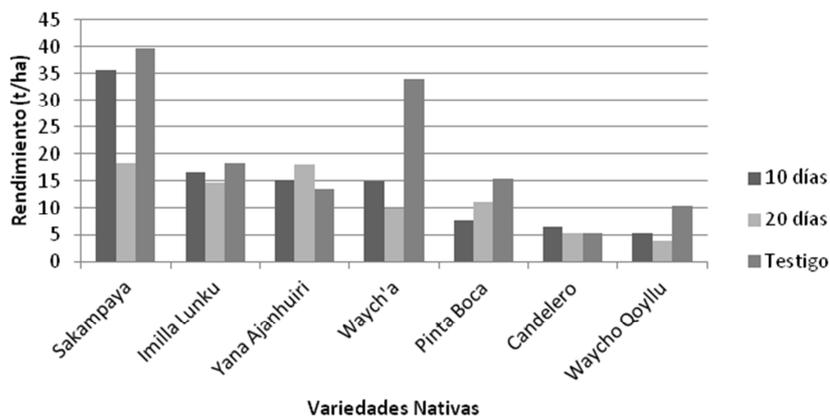


El análisis de varianza (Tabla 2), también mostró que existió interacción sequía * cultivar. Esto significa que el efecto de cada tratamiento de sequía fue diferente en los diferentes cultivares ($Pr < 0,01$). Esto indica que los cultivares nativos de mayor resistencia y las de mayor susceptibilidad fueron diferentes en las dos diferentes sequías (10 y 20 días). Esto significaría que la resistencia a la sequía en estos cultivares dependería de la duración de la misma.

En la Figura 2 se hizo una comparación de las severidades obtenidas para los siete cultivares con el tratamiento de 10 días y se observó que el cultivar Imilla lunku fue más tolerante que seis de los cultivares incluido el testigo Waych'a. Por otra parte, los cultivares Waych'a, Sakampaya y Candelero podrían ser consideradas como las más susceptibles para un periodo de 10 días sin riego en invernadero.

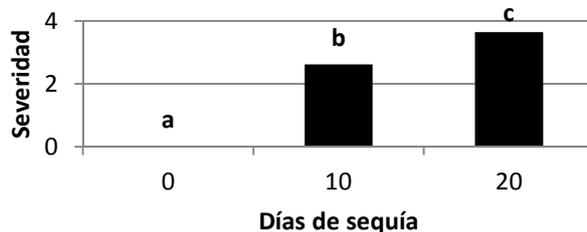
En el caso del tratamiento de 20 días sin riego (Figura 2) se observó que los cultivares Imilla Lunku, Waycho Qoyllu, y Sakampaya fueron más resistentes y/o tolerantes a sequía que los cultivares Yana Ajanhuiri, Candelero y Pinta Boca.

Figura 2. Grado de severidad para ocho cultivares nativos sometidas a 10 y 20 días de estrés hídrico por sequía. Año 2012



En la Figura 3 se muestra la comparación de medias entre las severidades de los tres niveles de sequía para cada cultivar. Donde se observó que el nivel de 20 días de sequía causó mayor daño en cada cultivar.

Figura 3. Severidad para siete cultivares nativos sometidos a 10 y 20 días de estrés hídrico por sequía. Año 2012



En el caso de los cultivares Waychu Qoyllu, Sakampaya y Waych'a se observó que las sequías de 10 y 20 días causaron el mismo efecto (Figura 1). Estos cultivares podrían ser interesantes como fuente de resistencia ya que muestran la misma respuesta a diferentes niveles de sequía. En cambio,

para el resto de los cultivares, la sequía de 20 días causó mayor severidad que la de 10 días.

El análisis de varianza para rendimiento (Tabla 3) mostró que no hubo diferencias significativas para sequía ni para cultivar. Esto indicó que ninguno de los tratamientos de sequía tuvo ningún efecto sobre el rendimiento en general para los siete cultivares. Sin embargo, se observó que el cultivar Waych'a redujo su rendimiento bajo ambos tratamientos de sequía (Figura 2). Para la variedad Sakampaya se observó también una reducción marcada del rendimiento solo para el tratamiento de 20 días de sequía.

Tabla 3. Componentes de varianza del rendimiento (t/ha) para siete cultivares nativos de papa sometidos a tres niveles de sequía. Año 2012

F.V.	GI	C.M. (R)
Total	86	
Bloque		0.53
Sequía	2	0.06
Cultivar	6	0.39
Bloque*Sequía	4	0.25
Sequía*Cultivar	12	0.16
Error	60	0.18
C.V.		24.5
R ²		0.42

Leyendas: ** - Diferencias significativas a $Pr < 0.01$, (R) – Rendimiento (t/ha).

Análisis de la actividad enzimática

El análisis de T-test para cuatro cultivares en dos tratamientos de sequía (T) y su testigo (C) mostró diferencias significativas al $Pr < 0.05$ de probabilidad para los cultivares Pinta boca y Waychu qoyllu para la CAT (Tabla 4), pero no hubo diferencias significativas para APX y POX para ninguno de los cuatro cultivares analizados.

Tabla 4. Análisis de T-test para reacción a la actividad enzimática a sequía en dos cultivares de papas resistentes y dos susceptibles. Año 2012

Cultivar	REHS	Enzima	T	C	Dif.	Prob.
Pinta boca	R	CAT	916,1	308,3	607,7	0,03
		APX	3355,5	2773,8	581,7	0,56
		POX	764,1	309,51	454,6	0,13
Waychu qoyllu	R	CAT	911,8	167,25	744,5	0,00
		APX	2891,1	2322,6	568,5	0,25
		POX	607,0	370,1	236,8	0,34
Candelerero	S	CAT	236,5	442,1	-205,6	0,26
		APX	2502,1	2998,3	-496,2	0,99
		POX	468,6	750,73	-282,1	0,66
Sakampaya	S	CAT	1854,5	1467,0	387,5	0,77
		APX	568,71	4732,9	-4164,1	0,68
		POX	1044,2	1448,6	-404,4	0,82

Leyendas – CAT: Catalasa, APX: Ascorbato peroxidasa , POX: guaiacol peroxidasa, R: Resistente, MR: Moderadamente resistente, S: Susceptible, T: Promedio planta estresada, C: Promedio planta control, Dif.: Diferencia entre T y C, Prob.: Significativo al $Pr < 0,05$ de probabilidad. Números en negrilla son significativos al $Pr < 0,05$ de probabilidad.

Análisis a los 10 días de estrés hídrico por sequía

Se observó que los cultivares Yana ajanhuiri, Imilla lunku, Pinta boca y Waychu qoyllu (Tabla 5) mostraron valores mayores al de sus propios controles en la actividad enzimática de la CAT (192,4 U/g, 132,3 U/g, 71,3 U/g y 291,3 U/g respectivamente), APX (2388,1 U/g, 2100,7 U/g, 3225,9 U/g y 2189,6 U/g respectivamente) y POX (425,9 U/g, 521,3 U/g, 99,5 U/g y 523,7 U/g respectivamente). Esto indicó que la actividad de éstas enzimas estaría relacionada con la tolerancia a sequía de 10 días en estos cultivares. En cambio, los cultivares Waych'a, Candelerero y Sakampaya, mostraron valores por debajo de sus respectivos controles. Indicando asimismo, que la ausencia de

actividad de estas enzimas conferiría susceptibilidad a la sequía de 10 días.

Análisis a los 20 días de estrés hídrico por sequía

Se observó que los cultivares Pinta boca y Waychu qoyllu nuevamente mostraron valores mayores de la actividad enzimática de la CAT, APX y POX (Tabla 5), respecto de sus controles. Sin embargo, solo Waycho qoyllu expreso tolerancia a sequía, lo que confirmó que la tolerancia a sequía estaría relacionada con la actividad de estas enzimas. Por otra parte, esta actividad enzimática no sería suficiente para conferir resistencia y/o tolerancia en Pinta boca frente a sequías prolongadas.

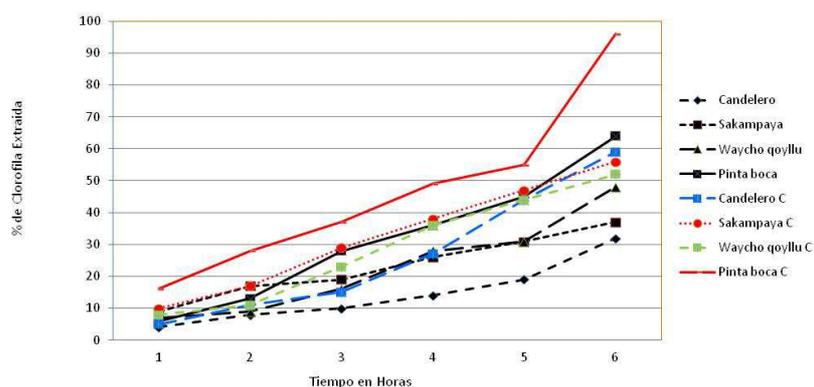
En cambio, los cultivares Candelero y Sakampaya volvieron a mostrar valores por debajo de sus respectivos controles, en la actividad enzimática de la CAT y POX.

Contrariamente a lo que se esperaba, el cultivar Sakampaya mostró altos valores en la actividad enzimática para APX (2177,9 U/g) respecto a su control. Esto explicaría la baja severidad obtenida por este cultivar para la sequía de 20 días. La actividad enzimática que confiere tolerancia recién se produce bajo periodos largos de sequía.

Permeabilidad cuticular

En referencia a la permeabilidad cuticular (Figura 4), se observó que los cultivares Waychu qoyllu y Pinta boca mostraron altos contenidos de clorofila en comparación a los otros cultivares y menor contenido de clorofila en relación a sus controles. Esto indicó que los cultivares tolerantes a sequía tuvieron un mayor contenido de clorofila que los cultivares susceptibles.

Figura 4. Pérdida de clorofila en cultivares nativos de papa. Año 2012



Leyendas: Cultivares en sequía (Candelerero, Sakampaya, Waycho Qoyllu, Pinta boca); Cultivares sin sequía o control (Candelerero C, Sakampaya C, Waycho Qoyllu C, Pinta boca C).

Discusión

Se confirmó a través de la evaluación en invernadero y laboratorio, que los cultivares de papa Imilla lunku y Waychu qoyllu fueron tolerantes y/o resistentes a la sequía. El cultivar Sakampaya aparentemente tiene otros mecanismos que le permite reaccionar mejor a estreses más drásticos de sequía.

Estos cultivares pueden ser utilizados en ambientes donde hay escasez de lluvias y también como fuente valiosa de genes para transferir a otros cultivares.

El mecanismo antioxidante que se ha utilizado para explicar estos resultados se basa en la eliminación del exceso de especies reactivas del oxígeno (ERO), formadas en las plantas

Tabla 5. Actividad de las enzimas antioxidantes CAT, APX y Pox en siete cultivares nativos de papa sometidas a 10 y 20 días de sequía. Año 2012.

Variedad	Tratamiento	10 Dias			20 Dias		
		CAT (U/g)	APX (U/g)	Pox (U/g)	CAT (U/g)	APX (U/g)	Pox (U/g)
Yana Ajanhuiiri	T	192,4	2388,1	425,9	-	-	-
	C	132,3	2100,7	521,3	-	-	-
Imilla lunko	T	158,6	2277,2	318,0	-	-	-
	C	157,8	1841,1	222,0	-	-	-
Waych'a	T	81,4	1609,0	477,7	-	-	-
	C	263,7	1906,7	523,2	-	-	-
Pinta boca	T	371,3	3225,9	99,5	491,1	2146,7	153,1
	C	175,7	2353,1	63,6	258,4	1874,3	108,2
Waychu qoyllo	T	291,3	2189,6	523,7	860,3	2850,1	426,0
	C	91,8	2044,7	168,9	102,3	2103,3	361,4
Candelero	T	150,7	1983,8	107,6	102,3	1806,6	290,1
	C	190,7	2267,9	132,4	302,6	2635,5	494,4
Sakampaya	T	75,3	2550,7	224,1	334,9	2177,9	84,0
	C	226,7	2778,2	364,3	407,7	2143,3	179,1

Leyendas: CAT: Catalasa, APX: Ascorbato peroxidasa, Pox: guaiacol peroxidasa, T: Promedio planta estresada, C: Promedio planta control.

bajo estreses abióticos, lo cual se atribuye a la acción eficiente de estas enzimas como la CAT, APX, POX en su conjunto.

En condiciones normales, la producción y remoción de las ERO está estrictamente controlada. Sin embargo, el equilibrio entre la producción y la depuración de éstas puede ser perturbado por diversos factores fisicoquímicos, como son el déficit hídrico, la salinidad, las temperaturas extremas, etc. (Mano, 2002).

En situaciones de estrés abióticos la planta incrementa su velocidad de producción de especies oxidantes o se da una disminución en la actividad de la defensa antioxidantes, terminando en el aumento de las concentraciones de las ERO (Sharma *et al.*, 2012). Ahora la actividad antioxidante no sólo se interpreta como el proceso de atrapar ERO sino también como un mecanismo que evita la formación de estas ERO, junto a procesos de reparación y eliminación de los productos de oxidación, por lo que resulta importante realizar la evaluación de todos en conjunto (Mano, 2002).

La actividad enzimática (de enzimas antioxidantes) implica la capacidad de detoxificar el H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno) en las plantas, entonces si la actividad enzimática es elevada respecto del control, indica que la planta tiene la capacidad de eliminar estas ERO y expresar tolerancia a sequía.

Los cultivares nativos Waycho Qoyllu y Pinta Boca mostraron una actividad enzimática significativamente incrementada respecto de los controles en todos los casos (CAT, APX y POX) considerándoselas por lo tanto como resistentes y/o tolerantes a sequía.

También pudimos observar que hubo cultivares nativos cuyas actividades están incrementadas respecto del valor del control, pero no tuvieron un incremento en su actividad que sea significativo como se observó con los cultivares Sakampaya e Imilla lunku, es decir tuvieron un comportamiento casi similar al de su control y finalmente los cultivares que mostraron una actividad disminuida en relación al control, no tuvieron la capacidad de eliminar o reducir el efecto oxidante de las ERO

formadas por el estrés al que fueron sometidas, como es el caso de los cultivares Waych'a y Candelerero.

Sin embargo, es importante considerar que la actividad enzimática puede variar por distintas causas, como el estadio fisiológico de la planta u órgano en el momento de la colecta y procesamiento de las muestras (independientemente de los requisitos tomados en consideración), y además por los factores ambientales como la temperatura, el pH y el estado hídrico de la planta, a ello se debe añadir el método empleado para la extracción y cuantificación enzimáticas (Shylesh y Padikkala, 1999).

En todo caso, en estos siete cultivares se observó que el estrés hídrico por sequía afectó el rendimiento de aquellos cultivares que rinden más en condiciones normales (Waych'a y Sakampaya). En cambio, no hubo efecto sobre los cultivares que tienen bajos rendimientos en condiciones normales. La tolerancia a sequía en estos cultivares estaría estrechamente asociada con rusticidad y los genes que gobiernan este carácter podrían utilizarse como fuente de tolerancia y/o resistencia para incorporarlas en cultivares de alto rendimiento.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo económico del Proyecto Fontagro-papa, Cambio Climático (FTG – 8037/08).

Literatura citada

Aebi, H. 1983. Catalase *in vitro*. Metho Enz (105): 121-126.

Angulo, A. M. Siles; R. Ríos; J. Gabriel. 2009. Caracterización de 118 accesiones de arveja (*Pisum sativum* L.) del Banco de Germoplasma del Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pirumani para resistencia a sequía. Revista de Agricultura, Bolivia 42 (60): 25-31.

Arora, A.; R.K. Sairam; G.C. Srivastava. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.

Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235–241.

Blum, A. 1993. Selection for sustained production in water deficit environments. *Crop Sci* 1: 343-347.

Cabrera, Y.A. 2006. Efecto de *Phytophthora capsici* sobre el metabolismo del glutatión en suspensiones celulares de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Univ. Autónoma de Yucatán. Mérida, México. Tesis de Licenciatura.

Charco, J. 2002. Una introducción al estudio de la velocidad de regeneración natural del bosque mediterráneo y de los factores antropozoógenos que la condicionan. *In*: J. Charco García (ed.). La regeneración natural del bosque mediterráneo en la península Ibérica. ARBA & Ministerio de Medio Ambiente. Ciudad Real. p. 115-152.

Desikan, R.; M.K. Cheung; A. Clarke; S. Golding; M. Sagi; R. Fluhr; C. Rock; J. Hancock; S. Neill. 2004. Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol* 31: 913-920.

Desikan, R.; J.T. Hancock; S.J. Neill. 2003. Oxidative stress signaling. *In* H.Hirt and K. Shinozaki (eds.), *Plant responses to abiotic stress: topic in current genetics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 121-148.

Foyer, C.H. 2010. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Env* 28: 1056-1071.

Frary, A.; D. Göl; D. Keleş; B. Ökmen; H. Pınar; H.Ö Şığva; A. Yemenicioğlu; S. Doğanlar. 2010. Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology* 10:58 – 74.

Hernandez, J.A.; A. Jimenez. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant differences. *Plant Cell Env* 23: 853-862.

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

Kosma, D.K.; B. Bourdenx; A. Bernard; E.P. Parsons; S. Lü, J. Joubès; M.A. Jenks. 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. *Plant Physiol* 151: 1918-1929.

Mamani, P. 2000. Effet de la secheresse sur six varietés de pomme de terre dans les andes boliviennes. Tesis M.Sc., Universite Catholique de Louvain Faculte des Sciences Agronomiques, Belgique. 43 p.

Martinez-Garza, A. 1988. Diseños experimentales: Métodos y elementos de teoría. Editorial Trillas, México D.F., México. 756 p.

Mano, J. 2002. Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. Page 217-246 in *Oxidative stress in plants*, UK.

Moller, I.M.; P. Jensen; 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Ann Rev Plant Bio* 58: 459-481.

Nakano, Y.; K. Asada. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in Ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol* 28(1): 131-140.

Sharma, P.; A. Bhushan; R. Shanker; M. Pessaraki. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-12.

Parry, M.; C. Rosenzweig; M. Livermore. 2005. Climate change, global food supply and risk of hunger. *Phil Trans Royal Soc. B.* 2005; 360, 2125-2138.

Perl-Treves, R.; A. Perl. 2002. Oxidative Stress: An introduction in Inzé, D. and Van Montagu M. (ed). *Oxidative stress in plants*. London: Taylor & Francis: 1-32.

SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT Users Guide, Version 9.2, Fourth Edition, Vol. 2, SAS Institute Inc., Cary, N.C.

Sies, H. 1991. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Amer J Med* 91, 31-38.

Shylesh, B.S.; J. Padikkala. 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Emilia sonchifolia*. *Fitoterapia* 70 (3):275.
Terán, H.; S.P. Singh. 2002. *Biotechnology V14 CS3.indd* 262 en *Crop Sci*. 42: 64-70.

Toumi, I.; P.N. Moschou; K.A. Paschalidis. 2010. Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. *J Plant Physiol* 167: 519-525.

Zhang, J.Y.; C.D. Broeckling; E.B. Blancaflor; M.K. Sledge; L.W. Sumner; Z.Y. Wang. 2005. Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal*. 2005; 42, 689–707.