



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

---

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN BOTÁNICA**

**SENESCENCIA FOLIAR, COMPONENTES DEL RENDIMIENTO Y**

**DEGRADACIÓN NUCLEAR EN DOS VARIEDADES DE PAPA**

**(*Solanum tuberosum* L.) var. LUPITA Y TOLLOCAN**

**JOSÉ LUIS ZÁRATE CASTREJÓN**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

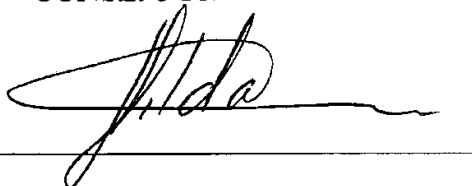
**2010**

La presente tesis, titulada: **Senescencia foliar, componentes del rendimiento en dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L. var. Lupita y Tollocan)**, realizada por el alumno: **JOSÉ LUIS ZÁRATE CASTREJÓN**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
POSTGRADO EN BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:




Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

ASESOR:



Dr. E. Mark Engleman

ASESOR:



Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2010

## RESUMEN

La senescencia foliar es la última etapa del desarrollo de la hoja, se caracteriza por una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y estructurales. Las hojas pierden gradualmente clorofila, se desorganiza la maquinaria fotosintética y se reciclan los productos de degradación de las macromoléculas hacia otras partes en crecimiento (hojas jóvenes, flores, frutos) u órganos de almacenamiento como el tubérculo en *Solanum tuberosum*. Se conoce poco acerca de la relación entre la senescencia foliar y proceso del llenado del tubérculo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la senescencia foliar en dos variedades de papa con diferente ciclo biológico y relacionarlo con el llenado del tubérculo. Se monitoreó el amarillamiento foliar en toda la planta a partir de los 40 hasta 90 días después de la siembra (DDS) con un SPAD-meter. Las variables medidas fueron: índice de área foliar (IAF), índice de cosecha (IC), tasa de crecimiento del tubérculo (TCT), contenido de almidón (método de antrona), contenido de proteínas solubles totales, presencia de la subunidad grande de Rubisco LSU (SDS-PAGE), integridad del ADN (geles de agarosa), estructura de la hoja y población de plastidios (histología) en diferentes fechas de muestreos (50, 72, 93 DDS). Los datos se analizaron estadísticamente con una comparación de medias (Duncan 0.05 %). El IAF mayor fue en Tollocan (7.61), el IC en Lupita fue de 0.85, la TCT mayor fue de 1.54 g m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> (Tollocan). El contenido de clorofila disminuyó de 2.54 a 0.22 µg mg PF<sup>-1</sup> en Lupita y 1.91 a 0.39 µg mg PF<sup>-1</sup> en Tollocan. La SDS-PAGE indicó que la LSU disminuyó con la senescencia de la hoja. El ADN no mostró fraccionamiento durante los primeros 93 DDS en las dos variedades. El espesor de hoja (256 µm) fue mayor en Tollocan, donde el parénquima esponjoso fue el que contribuyó en esta variable. La población de plastidios (no. plastidios celula<sup>-1</sup>) en las variedades estudiadas fue similar en el estado verde así como en la reducción de estos durante la senescencia. De acuerdo con los resultados el contenido de clorofila foliar puede ser usado como un indicador del llenado del tubérculo.

Palabras clave: ADN, cloroplastos, LSU, Rubisco, SDS-PAGE.

## SUMMARY

Leaf senescence is the final stage of leaf development, is characterized by a series of physiological, biochemical and structural change. Leaves lose chlorophyll, the photosynthetic machinery is disorganized and the degradation products of macromolecules are recycled to other growing parts (young leaves, flowers, fruits) or storage organs like tubers in *Solanum tuberosum*. Little is known about the relationship between leaf senescence and the tuber-filling process. The objective of the present research was to study leaf senescence in two potato varieties with different cycles and its relation with the tuber-filling. Leaf yellowing of the whole plant was monitored from the 40-90 days after sowing (DAS) with a SPAD-meter. The following variables were measured: leaf area index area (LAI), harvest index (HI), tuber growing rate TCT, starch content (anthrona method), total soluble proteins, presence of the large subunit of Rubisco LSU (SDS-PAGE), DNA integrity (agarose gel), leaf structure and plastid population (histology) on different sampling dates (50, 72, 93 DAS). The data were statistically analyzed with a comparison of means (Duncan 0.05%). The largest LAI (7.61) was observed in Tollocan, the Lupita's HI was 0.85, the TGR for Tollocan was 1.54 higher  $\text{g m}^{-2} \text{day}^{-1}$ . The chlorophyll content in Lupita decreased from 2.54 to 0.22  $\mu\text{g mg PF}^{-1}$  and in Tollocan was 1.91 to 0.39  $\mu\text{g mg PF}^{-1}$ . The SDS-PAGE indicated that the LSU decreased as the leaf senescence. DNA fragmentation was shown during the first 93 DAS in the two varieties. The leaf thickness (256  $\mu\text{m}$ ) was greater in Tollocan, where the spongy parenchyma tissue was the principal contributor to this variable. The plastid population (no. plastids  $\text{cell}^{-1}$ ) in the studied varieties was similar in the green stage as well as its reduction during senescence. Accordig with my results the leaf chlorophyll content can be used as an indicator of the tuber-filling.

Key words:;, cloroplast, DNA, LSU, Rubisco SDS-PAGE.

## **Agradecimientos**

**AL PUEBLO MEXICANO** trabajador que diario se esfuerza por superarse, a cada uno de ellos con admiración porque sin sus **IMPUESTOS** nunca hubiera tenido la oportunidad de seguir adelante, por medio de la beca, con mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada, siempre puntual, durante mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados por haberme aceptado como un miembro más de la comunidad académica.

A la Dra. Araceli Zavaleta que me ha tenido paciencia y gracias a ella logre superar una barrera personal, también porque me hizo cada vez más independiente durante mi formación en el postgrado.

Al Dr. Humberto López Delgado, Ing. Víctor Magallanes y M. en C. Ricardo Martínez Gutiérrez del Programa Nacional de Papa, INIFAP-Metepec, por proporcionarme las facilidades y el material biológico.

A mi consejo particular de maestría: Dr. Mark Engleman y Dr. Jesús Arenas Alatorre

Al Dr. José Alberto Escalante por apoyarme en todo momento.

Al M. en C. Jorge Valdez Carrasco por la ayuda proporcionada en la toma de imágenes.

## *Con dedicatoria especial...*

A mi sobrinito que aún no ha nacido pero sé que algún día leerá esto. A mis queridas y lindas hermanas **Elizabeth y Brenda** a mi **madre**, que siempre han tenido fé en todo lo que hago, a mi **padre** que me enseñó valores que nunca pierdo de vista.

A todos mis compañeros que he conocido en mi vida profesional. A los colegas que diario atienden a sus proyectos, alumnos, organismos, para engrandecer el nombre de su institución o del país, aún con los recortes presupuestales que cada año sufren las instituciones educativas desde que tengo conciencia política. A todos ellos mi admiración porque gracias a sus investigaciones son capaces de generar conocimiento para ayudar a los que menos tienen y con ello las desigualdades sociales no sean cada vez más abismales. Porque la enajenada sumisión ante los intereses egoístas de particulares no es la única manera de vivir en un mundo cada vez más globalizado.

También se lo dedico al **Arquitecto del Universo** maravilloso y mágico que forma parte de un vasto espacio que aún falta por conocer, pero de seguir con la destrucción de todo ser viviente, desde los pequeños organismos unicelulares hasta los organismos complejos, lo único que nos quedará es información estéril en los libros o artículos de divulgación.

Ante la estupidez de gobiernos mezquinos e ignorantes y aferrados a sus miserables ambiciones, se pierden muchas especies que pudieran darnos la clave para entender el mundo. Por lo anterior este trabajo lo dedico para aquellas personas que logran estar en armonía con sus semejantes y con los organismos que los rodean, y si la modernidad ha destruido muchas especies, también es cierto que puede mantenerlas en paz o tratar de salvarlas de la extinción.

“Los trabajadores crean la riqueza de una nación, no crean crisis” (SME); “El pueblo debe defenderse, pero no sacrificarse, el pueblo no debe dejarse arrasar ni acribillar, pero tampoco puede humillarse” (Salvador Allende).

En una ocasión escribí:

*Una frase resume mi sentir: Quería tan sólo intentar vivir aquello que tendía a brotar espontáneamente de mí. ¿Por qué había de serme tan difícil? H.H.*

Siempre he realizado actos que salen espontáneamente de mi ser, nunca me han sido difíciles de efectuarlos, al contrario, es el motor que conduce mi vida. En ocasiones me llevan a momentos agradables, en otras me conducen al llanto, pero como dice Hermann Hesse ¿Por qué había de serme tan difícil? Cuando mis actos dejen de ser espontáneos, se tornaran difíciles y quizá mi vida deje de ser como los sueños... el que cree en la belleza de sus sueños tendrá la posibilidad de crear un mundo nuevo, tendrá la oportunidad de conducir sus anhelos aún en la oscuridad, extender sus alas llenas de aspiraciones y volar a donde quiera e incluso a lugares prohibidos para muchos... como el lugar en donde los sueños se confunden con la morada del **Arquitecto del mundo** terrenal... JLZC.

“Cuando eliminamos de la mente los densos nubarrones de ignorancia, en el vacío original de la misma surge el revelador sonido de la iluminación” **Siddharta Gautama Buda.**

**Dedicado a los amigos de mi vida:** Eduardo Jimenez Quiroz, Edgar Oaxaca Hernandez, Sara Rosales Lemus, Jorge Espinoza Pérez, Francisco Olivie Carrión, Abdiel Hernandez Mendoza, Augusto Romero Tovar, Alejandra Hernández Ortega y Greta Rosas Saito y a todos que por motivos de espacio no puedo nombrarlos, pero tengan la certeza de que siempre me acuerdo de ustedes cuando me siento solo y me siento afortunado de contar con tantas amistades.

**Dedicado a mis compañeros:** Roberto Noguez, Silvia Rojo, Marilú Valencia, Rosalino Gasga del CP, Araceli Díaz, Eva Karina Chávez, Itzel Domínguez, Israel Chaparro, Oscar Gámez, Pedro Cervantes, Silvia Zapata, Ana María Amador y Rosalinda Gonzalez por haberme hecho feliz y útil en el SINAREFI.

| ÍNDICE   | Pág.     |
|--|----------|
| ÍNDICE DE CUADROS.....   | xii      |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | xiii     |
| ABREVIATURAS.....  | xvi      |
| <b>CAPÍTULO I. La senescencia foliar y los componentes del rendimiento en dos variedades de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) con diferente ciclo vegetativo.....</b> | <b>1</b> |
| 1. RESUMEN.....  | 2        |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 4        |
| 2.1 Biología de <i>Solanum tuberosum</i> L.....  | 4        |
| 2.1.1 Descripción botánica.....  | 4        |
| 2.1.2 Origen.....  | 7        |
| 2.1.3 Distribución.....  | 7        |
| 2.1.4 Ciclo biológico.....   | 7        |
| 2.1.5 Ciclo biológico de las variedades.....   | 8        |
| 2.2 Importancia económica.....   | 8        |
| 2.3 Importancia nutricional.....   | 9        |
| 2.4 Principales condiciones que inducen la tuberización.....   | 10       |
| 2.4.1 Fotoperiodo.....   | 10       |
| 2.4.2 Temperatura.....   | 10       |
| 2.4.3 Genotipo.....  | 11       |
| 2.4.4 Niveles bajos de nitrógeno.....  | 11       |
| 2.5 Formación del tubérculo.....   | 12       |
| 2.6 Translocación de macromoléculas durante la senescencia foliar.....   | 12       |
| 3. OBJETIVOS.....  | 14       |
| Objetivo general.....  | 14       |



|  |    |
|--|----|
| Objetivos específicos.....                               | 14 |
| 4. HIPÓTESIS.....  | 15 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....                             | 16 |
| 5.1 Obtención de plantas.....                            | 16 |
| 5.2 Rendimiento biológico y agronómico.....              | 16 |
| 5.3 Índice de área foliar (IAF).....                     | 17 |
| 5.4 Índice de cosecha (IC).....                          | 18 |
| 5.5 Cuantificación de almidón.....                       | 18 |
| 5.6 Pigmentos fotosintéticos.....                        | 19 |
| 5.6.1 Cuantificación química de la clorofila.....        | 19 |
| 5.6.2 Medición relativa de clorofila.....                | 19 |
| 5.6.3 Monitoreo de la senescencia de toda la planta..... | 22 |
| 5.7 Proteínas foliares.....                              | 22 |
| 5.7.1 Extracción de proteínas solubles totales.....      | 22 |
| 5.7.2 SDS-PAGE para la LSU de la Rubisco.....            | 22 |
| 5.8 Diseño experimental.....                             | 23 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                           | 25 |
| 6.1 Rendimiento biológico y agronómico.....              | 25 |
| 6.2 Índice de área foliar.....                           | 35 |
| 6.3 Índice de cosecha.....                               | 37 |
| 6.4 Cuantificación de almidones.....                     | 39 |
| 6.5 Pigmentos fotosintéticos.....                        | 39 |
| 6.5.1 Calibración del SPADmeter.....                     | 39 |
| 6.5.2 Senescencia de toda la planta.....                 | 46 |
| 6.6 Proteínas foliares.....                              | 50 |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.6.1 Cuantificación de proteínas solubles totales.....   | 50        |
| 6.6.2 Subunidad grande de la Rubisco (LSU).....   | 50        |
| 7. CONCLUSIONES.....  | 67        |
| 8. LITERATURA CITADA.....   | 68        |
| <b>CAPÍTULO II. Cambios estructurales y degradación nuclear en dos variedades de <i>Solanum tuberosum</i> L. var Lupita y Tollocan durante la senescencia foliar.....</b> | <b>74</b> |
| 1. RESUMEN.....   | 75        |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 77        |
| 2.1 Senescencia.....  | 77        |
| 2.2 Cambios bioquímicos.....  | 81        |
| 2.3 Cambios fisiológicos.....   | 83        |
| 2.4 Cambios subcelulares.....   | 84        |
| 2.5 Degradación nuclear.....  | 85        |
| 3. OBJETIVOS.....   | 88        |
| Objetivo general.....   | 88        |
| Objetivos específicos.....  | 88        |
| 4. HIPÓTESIS.....   | 89        |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 90        |
| 5.1 Material biológico.....   | 90        |
| 5.2 Estructura foliar.....  | 90        |
| 5.3 Conteo de cloroplastos.....   | 91        |
| 5.4 Integridad del ADN.....   | 92        |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 94        |
| 6.1 Estructura foliar.....  | 94        |
| 6.2 Conteo de cloroplastos.....   | 94        |

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 6.3 Integridad del ADN..... | 104 |
| 7. CONCLUSIONES.....        | 109 |
| 8. LITERATURA CITADA.....   | 110 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Número      | Cuadro  | Página |
|-------------|---|--------|
| CAPÍTULO I  |   |        |
| 1           | Cuadro 1. Aspectos fisiotécnicos de la var. Lupita ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) durante un ciclo de cultivo.....                      | 32     |
| 2           | Aspectos fisiotécnicos de la var. Tollocan ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) durante un ciclo de cultivo.....                              | 33     |
| 3           | Índice de cosecha (IC) en dos variedades con diferente ciclo biológico, Lupita (corto) y Tollocan (intermedio).....                     | 38     |
| 4           | Contenido de clorofila y proteínas solubles totales de hojas de la var. Lupita y la var. Tollocan durante el llenado del tubérculo..... | 53     |
| CAPÍTULO II |   |        |
| 5           | Algunos caracteres anatómicos de las hojas de las variedades Lupita y Tollocan.....   | 96     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Número     | Figura   | Página |
|------------|--|--------|
| CAPÍTULO I |  |        |
| 1          | Componentes morfológicos de la planta de papa ( <i>S. tuberosum</i> L.), Huamán 1986.....  | 6      |
| 2          | Estolón de la planta de papa previo a la tuberización. La flecha indica el gancho en el ápice, el sitio donde se formará la futura papa o tubérculo.....   | 13     |
| 3          | Figura 3. Medidor relativo de clorofila y diferentes grados de amarillamiento. a) Medidor de clorofila portátil SPAD-meter Minolta 502, b) hoja en estado verde (41 SPAD), c) hoja con senescencia temprana (23-26 SPAD) d) hoja con senescencia tardía (<5 SPAD)..... | 21     |
| 4          | Distribución de materia seca por componente morfológico durante un ciclo de 93 días (n=5). A) var. Lupita, B) var. Tollocan.....   | 27     |
| 5          | Tubérculos de 5 plantas del primer muestreo (50 DDS). A) var. Lupita, B) var. Tollocan.....  | 29     |
| 6          | Tubérculos de 5 plantas del segundo muestreo (72 DDS). A) var. Lupita, B) var. Tollocan.....   | 30     |
| 7          | Tubérculos de 5 plantas cosechados a los 93 DDS. A) var. Lupita, B) var. Tollocan.....   | 31     |
| 8          | Razón del peso seco del tubérculo entre peso seco de la parte aérea de las variedades Lupita y Tollocan.....   | 34     |
| 9          | Índice de área foliar (IAF) de las variedades Lupita y Tollocan en diferentes fechas de muestreo (DDS).....  | 36     |
| 10         | Relación entre la cantidad de almidón y el peso fresco de la papa, durante los tres muestreos realizados A) var. Lupita, B) var. Tollocan...   | 41     |
| 11         | Relación SPAD y concentración de clorofila total de las hojas de la var. Lupita (ciclo corto) durante la senescencia.  | 42     |

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| 12          | Relación SPAD y concentración de clorofila total de las hojas de la var. Lupita (ciclo corto) durante la senescencia.....  | 43  |
| 13          | Relación SPAD y concentración de xantofilas y carotenoides de las hojas de la var. Lupita (ciclo corto) durante la senescencia.....  | 44  |
| 14          | Relación SPAD y concentración de xantofilas y carotenoides de las hojas de la var. Tollocan (ciclo intermedio) durante la senescencia.                                     | 45  |
| 15          | Clorofila total promedio de toda la planta durante el ciclo biológico de las var. Lupita y Tollocan.....   | 48  |
| 16          | Relación de clorofila total y peso seco del tubérculo. A) var. Lupita B) var Tollocan.....   | 49  |
| 17          | Relación de proteínas totales y número de plastidios, en este caso no se tuvo un conteo de plastidios a los 39 DDS. A) var. Lupita, B) var. Tollocan.....                  | 52  |
| 18          | Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) del foliolo terminal de la cuarta o quinta hoja de la var. Lupita. Abundancia de la LSU de Rubisco a los 39, 50, 72 y 93 DDS.....   | 54  |
| 19          | Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) del foliolo terminal de la cuarta o quinta hoja de la var. Tollocan. Abundancia de la LSU de Rubisco a los 39, 50, 72 y 93 DDS..... | 55  |
| CAPÍTULO II |  |     |
| 20          | Corte semifino (2 $\mu$ m) del foliolo terminal de la hoja de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) var. Lupita en estado verde (51 SPAD).....                                      | 97  |
| 21          | Corte semifino (2 $\mu$ m) del foliolo terminal de la hoja de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) var. Lupita en estado inicial de senescencia (S1: 23 SPAD).                     | 98  |
| 22          | Corte semifino (2 $\mu$ m) del foliolo terminal de la hoja de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) var. Lupita en estado avanzado senescente (S2: 7 SPAD)...                       | 99  |
| 23          | Corte semifino (2 $\mu$ m) del foliolo terminal de la hoja de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) var. Tollocana en estado verde (46 SPAD). ....                                  | 100 |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 24 | Corte semifino (2 $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) var. Tollocan en estado inicial de senescencia (S1: 22 SPAD)..... | 101 |
| 25 | Corte semifino (2 $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) var. Tollocan en estado avanzado de senescencia (S2: 6 SPAD)..... | 102 |
| 26 | Población de plastidios durante la senescencia foliar de las variedades Lupita y Tollocan.....  | 103 |
| 27 | Análisis de ADN en gel de agarosa. A) Variedad Lupita, B) Variedad Tollocan.....  | 105 |

## Abreviaturas

|          |   |
|----------|---|
| CTAB     | Bromuro de cetil trimetil amonio                                    |
| DAF      | Dosel aparentemente fotosintético                                   |
| DDS      | Días después de siembra   |
| DTT      | Ditiotreitol  |
| EDTA     | Ácido etilendiaminotetra acético                                    |
| IAF      | Índice de área foliar   |
| IC       | Índice de cosecha   |
| kcal     | Kilocaloría   |
| kDa      | Kilodaltones  |
| LSU      | Subunidad grande de la Rubisco                                      |
| PCD      | Muerte celular programada por sus siglas en inglés                  |
| PEPC     | fosfoenolpiruvato carboxilasa                                       |
| PPDK     | fosfoenolpiruvato diquinasa   |
| PF       | peso fresco   |
| PS-I     | Fotosistema I   |
| PS-II    | Fotosistema II  |
| PVP      | Polivinilpirrolidona  |
| Rubisco  | Ribulosa- 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa                       |
| SDS      | Dodecil sulfato de sodio  |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio |
| SSU      | Subunidad pequeña de la Rubisco                                     |
| TCT      | Tasa de crecimiento del tubérculo                                   |
| TEMED    | N´N´N´N´ - tetrametilendiamina                                      |
| β-ME     | β-mercaptoetanol  |



# C A P Í T U L O I

**La senescencia foliar y los componentes del rendimiento en las variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) Lupita y Tollocan.**

## 1 . R E S U M E N

La papa (*Solanum tuberosum*) es el cuarto cultivo alimenticio más importante en el mundo, pertenece a la familia de las Solanaceas, la cual tiene importancia económica. Presenta tres tipos de tallos: 1) aéreo, 2) estolón que es subterráneo y 3) el tubérculo que es un tallo subterráneo modificado para reserva. La papa es originaria del Perú y se distribuyó mundialmente después de la conquista española y para su propagación se utiliza el tubérculo. Las variables que propician la tuberización son el fotoperiodo, temperatura, concentración de sacarosa, genotipo, edad fisiológica y niveles bajos de nitrógeno. Durante la senescencia foliar, las macromoléculas se metabolizan a sus componentes básicos y se transportan hacia sitios de demanda como son las zonas meristemáticas o hacia los sitios de almacenamiento como el tubérculo de papa.

Poco se conoce de la relación entre la senescencia foliar en *Solanum tuberosum* y el llenado del tubérculo por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo analizar la senescencia y el rendimiento de la papa en dos variedades con diferente ciclo biológico.

La siembra se realizó el 1 de septiembre de 2008 en el Programa Nacional de Papa. Se monitoreó la senescencia en toda la planta a partir de los 40 DDS. Se realizaron tres muestreos durante su ciclo biológico (50, 72 y 93 DDS), en cada muestreo las plantas se separaron en tubérculo, tallo, peciolo y hoja. Se midió el contenido de proteínas solubles totales y se separaron por electroforesis (SDS-PAGE).

Los resultados de la distribución de la materia seca, en la parte aérea de la planta mostraron que los asimilados se concentraron más en la lámina, presentando mayores valores acentuándose la variedad de ciclo intermedio (Tollocan).

Paralelamente se midió el contenido de almidón en el tubérculo, materia seca por componente botánico (tallo, peciolo, lámina y tubérculo), tasa de crecimiento del tubérculo y biomasa, índice de área foliar (IAF) e índice de cosecha (IC). Los resultados

se analizaron estadísticamente con una comparación de medias (Duncan 0.05 %) entre días y variedades. Los resultados indican diferencias en el contenido de clorofila, en la biomasa, tasa de crecimiento del tubérculo. La presencia de la enzima Rubisco disminuyó al envejecen las hojas. El IC de la var. Lupita fue mayor, que la var. Tollocan. El IAF fue mayor en la variedad intermedia en las tres fechas de muestreo (50, 72 y 93 DDS).

Se concluye que ambas variedades pierden sus pigmentos fotosintéticos de manera exponencial, la var. Lupia degrada más rápido la clorofila que la var. Tollocan. La var. Lupita tuvo mayor contenido de clorofila y mayor abundancia de la LSU. En el caso de las hojas de cada variedad de papa, presentaron características que responden a las necesidades de acuerdo al ciclo biológico, como un IAF alto (Tollocan) o una mayor concentración de clorofila (Lupita).

## 2 . A N T E C E D E N T E S

### 2.1 Biología de *Solanum tuberosum* (L.)

**2.1.1 Descripción botánica.** La papa (*Solanum tuberosum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, grupo de plantas que presentan especies de interés económico como: el chile (*Capsicum* spp.), berenjena (*Solanum melongena* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), jitomate (*Lycopersicon esculentum*), tomate (*Physalis peruviana* Lam.), petunia (*Petunia* spp.), huela de noche (*Cestrum nocturnum* L.), copa de oro (*Solanandra* spp.) y belladona (*Atropa belladonna* L.) (Calderón y Rzendowski, 2001). En *S. tuberosum* se reconocen dos subespecies: *andigena* y *tuberosum* (Huaman, 1986): la primera está restringida en la región de los Andes, mientras que la segunda es cultivada en todo el mundo (Bayer, 2008). La papa es una planta herbácea perenne que se comporta como anual. Es perenne debido a que presenta yemas de crecimiento en el tubérculo que son capaces de dar origen a otra planta genéticamente igual a la planta madre; es anual porque al finalizar su ciclo de vida, la parte aérea muere (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista botánico *S. tuberosum* presenta flores bisexuales con los cuatro elementos esenciales de una flor completa: cáliz, corola, estambre y pistilo. La flor es pentámera, con pétalos de distintos colores (blanco, azul claro, rojo, morado con diferentes tonalidades). El ovario súpero, bilocular y placentación axilar; al ser fertilizado el ovario se convierte en un baya, la cual generalmente es esférica de color verde aunque llega a tener pigmentaciones; el número de semillas contenidas en el fruto llegan a ser 200 (Huamán, 1986). Las hojas son compuestas de tres a cinco folíolos, la filotaxia en espiral, con un peciolo terminal y folíolos laterales secundarios o incluso terciarios. La epidermis presenta tricomas simples y glandulares de cabeza pluricelular (Salas *et al.*, 2003). Los tallos subterráneos o estolones son tuberosos, las raíces

derivadas de los tubérculos salen de los nudos también llamados ojos del tubérculo (Rubio *et al.*, 2000). Las semillas botánicas son pequeñas (menores a 1 mm), ortodoxas, poco viables, aplanadas lateralmente, con testa delgada, embrión curvo (campilótropo). Las plantas de papa pueden desarrollarse a partir de semilla botánica que al germinar forman una raíz axonomorfa con ramificaciones laterales (Huamán, 1986) raíces muy delgadas y débiles que sostienen a una plántula de poco vigor. Por lo anterior el tubérculo se utiliza como semilla agronómica para su propagación, ya que los brotes que se generan de sus yemas son vigorosos y abundantes.

La papa muestra tres tipos de tallos: a) el aéreo, que sostiene a las hojas de forma triangular o circular visto en corte transversal; b) el estolón, que es un tallo modificado subterráneo y c) el tubérculo que es un tallo engrosado subterráneo el cual presenta yemas axilares, por medio de las cuales se origina una nueva planta (Salas *et al.*, 2003; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006) (Figura 1).

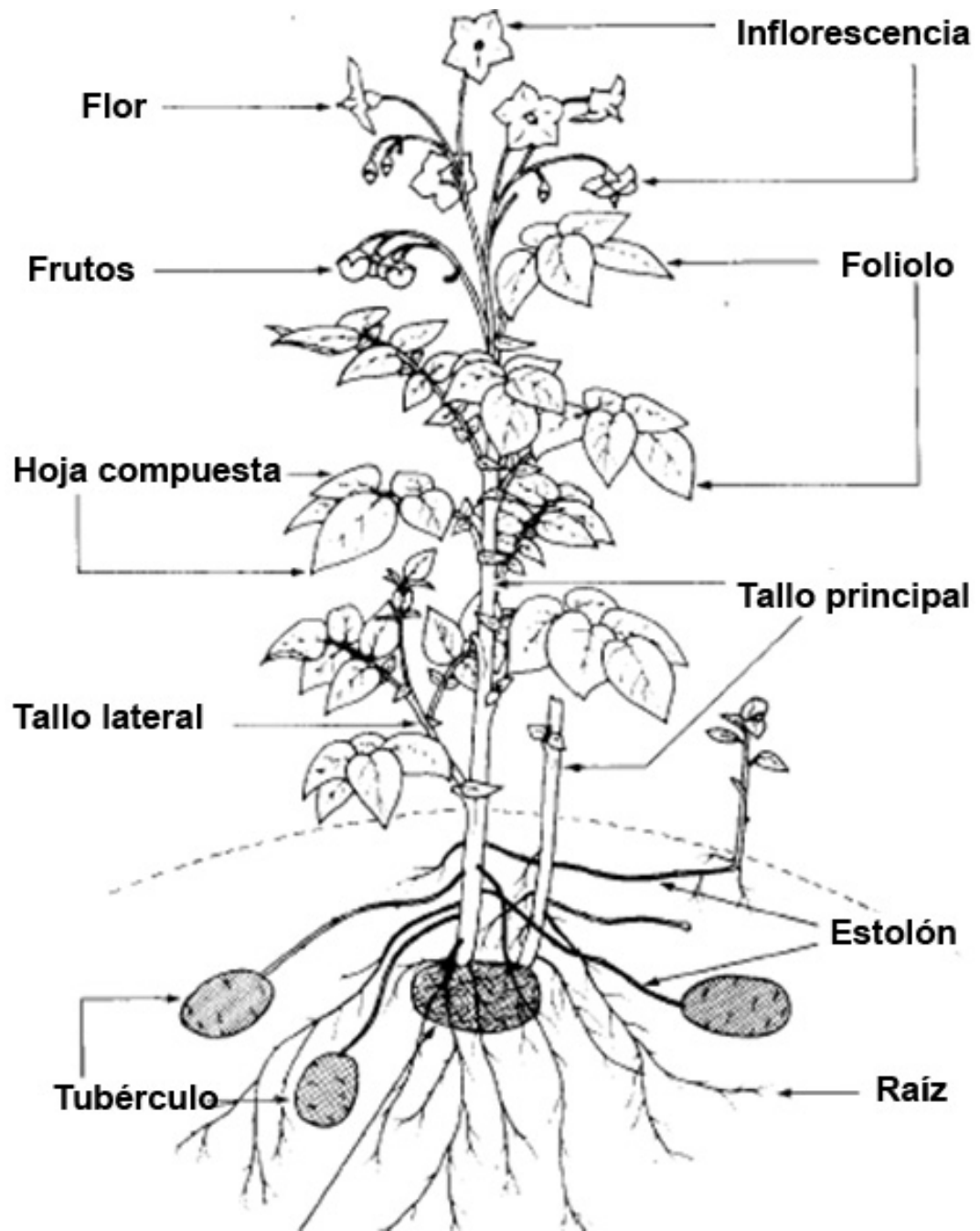


Figura 1. Componentes morfológicos de la planta de papa (*S. tuberosum* L.). Huamán 1986.

**2.1.2 Origen.** El centro de origen de la papa son los Andes, en las cercanías del lago Titicaca, en la zona de Machupichu, (2,500 y 4,000 m) Perú. Existe evidencia de que la papa silvestre se consumía en la parte norte del lago Titicaca. Posteriormente la papa se domesticó por los Quechuas nativos de los Ándes. Durante la conquista española, la papa fue llevada a numerosos países de Europa y el resto del mundo, convirtiéndose en un importante cultivo. En la época actual el continente Americano cuenta con 200 especies de papas silvestres (FAO, 2008; Bayer, 2008).

**2.1.3 Distribución.** La papa se dispersó fuera de los Ándes después que los españoles conquistaron al imperio Inca (1532-1572). Las características del tubérculo facilitaron su traslado y cultivo fuera del continente, presentándose una excelente adaptación del cultivo a nuevos ambientes y condiciones. En 1565 se introdujo en las Islas Canarias, en 1573 en la península Ibérica, después a Francia y los Países Bajos. En la década de 1770, Europa entró en una hambruna y se reconoció a la papa como un cultivo que daba seguridad alimentaria. En 1815 fue un cultivo importante en el norte del continente; entre los años de 1844 y 1845, los cultivos fueron afectados por el hongo (*Phytophthora infestans* Mont.), esto condujo a la pérdida de los cultivos siendo Irlanda el país que más sufrió de este problema, ocasionando la muerte de un millón de personas por hambruna y otro millón migró a tierras Americanas. La papa llega al continente asiático (Japón, China e India) gracias a los marinos, debido a que encontraron en ésta un alimento práctico y seguro para sus travesías (Bayer, 2008). Fue hasta el siglo XX en que la papa se cultivo al nivel mundial (FAO, 2008).

**2.1.4 Ciclo de biológico.** En la siembra de papa se usa el tubérculo-semilla por las ventajas agronómicas que representa, además de conservar las características de la

variedad de interés. A escala comercial se usa el tubérculo-semilla de tamaño pequeño (30-40 g) (FAO, 2008). Debe pasar un período de latencia antes de la siembra del tubérculo, cuando ésta se pierde aparecen los primeros brotes en la yema apical, seguida de los brotes laterales. En la etapa de emergencia aparecen los tallos subterráneos, provenientes de los brotes basales del tubérculo, y el tallo aéreo originado del ápice dominante. Los estolones se forman de las yemas de los nudos de los tallos en ausencia de luz. Cada tallo principal termina su ciclo cuando ocurre la floración y fructificación (Segura *et al.*, 2006). El tubérculo se forma cuando la punta del estolón comienza a ensancharse, convirtiéndose en la principal demanda de los fotoasimilados de las hojas. La parte aérea crece, se ramifica, forma follaje y produce flores; después de la floración se inicia su senescencia y luego muere para terminar su ciclo.

**2.1.5 Ciclo biológico de las variedades.** El período (número de días) de crecimiento del cultivo de la planta depende del inicio de la tuberización (Borrego *et al.*, 2000). Se han clasificado tres tipos de ciclo de vida en los que el llenado del tubérculo está implicado: a) ciclo corto, donde el llenado del tubérculo ocurre antes de los 90 días después de la siembra (DDS); b) ciclo intermedio, entre los 90 y 120 DDS y c) ciclo tardío, de 120 a 180 DDS

(<http://research.cip.cgiar.org/potato/GR/table.php?grp=allPV&tmpl=potato&fmt=html>)

## **2.2 Importancia económica**

**Nivel mundial.** La papa es el cuarto cultivo de importancia alimenticia a nivel mundial, después del maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oriza sativa* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Jackson, 1999). La papa es una fuente importante de almidón, alcohol y materia prima en la industria de frituras (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Se consume en



130 naciones y en muchos lugares se le considera como producto básico. En el año 2007, se tuvo una cosecha mundial de 321 millones de t, de la cual 70% de la producción proviene de los países desarrollados. De acuerdo con las estadísticas de la FAO los países mayores productores y consumidores son: China (72, 000,000 t), la federación Rusa (36, 000,000 t) y la India (26, 000,000 t). Hasta el año 1990, los principales productores del tubérculo se concentraban en Rusia, América del Norte y Europa; ahora la demanda ha ido en aumento y como consecuencia varios países se suman en la producción de la papa. Por ejemplo, los países en desarrollo lograron en el año de 1995 una mayor producción, comparada con los países desarrollados (FAO, 2008).

**Nivel nacional.** De acuerdo con los datos de INEGI (2006) en México, se tuvieron en promedio 64,853 ha para siembra de papa, entre el año 2000 y 2005; de las cuales en promedio se produjeron 1,590,272 t, siendo el estado de Sinaloa el principal productor del tubérculo, con un promedio de 310,426 t; seguido de los estados de Sonora y Chihuahua, con 216,436 y 185,377 t. El resto de la producción se reparte entre los demás estados de la república Mexicana.

### **2.3 Importancia nutricional**

La papa es rica en almidones, su contenido de proteínas es similar a los cereales, es una fuente de fibra y el contenido de grasa es bajo. Por ejemplo un tubérculo mediano (5 cm), aporta casi la mitad del requerimiento diario de vitamina C para un adulto (Rodríguez-Falcón, 2006). De cada 100 g de peso fresco el 82% es comestible, contiene fibra (0.5 g), proteína (1.6 g), calcio (13 mg), hierro (13 mg), ácido ascórbico (15 mg), tiamina (0.1 mg), niacina (1.1 mg) y un provee un promedio de 76 kcal (INEGI, 2006; Mullins *et al.*, 2006).

## **2.4 Principales condiciones que inducen la tuberización.**

La tuberización es el proceso por el cual los órganos subterráneos se desarrollan a partir de un tallo. Los tubérculos son tallos modificados (estolón), los cuales se hinchan y presentan entrenudos cortos. El estolón se desarrolla en la base del tallo principal y es a partir de este órgano que se forma el tubérculo (Rodríguez-Falcón, 2006). Cuando los factores no favorecen la tuberización, los estolones crecen hacia arriba y se forma un tallo aéreo normal (Jackson, 1999). Las variables que propician la tuberización son: fotoperiodo, temperatura, niveles altos de sacarosa, genotipo, edad fisiológica y niveles bajos de nitrógeno (Rodríguez-Falcón, 2006; Viola *et al.* 2001; Jackson, 1999).

**2.4.1 Fotoperiodo.** El proceso de tuberización se induce cuando la duración del día es menor de 8 h de luz y se inhibe cuando el periodo es de 14 h. Lo importante es la duración sin interrupción del periodo de oscuridad según Jackson (1999). Se menciona que las hojas sometidas a un periodo de 8 h luz (condiciones inductoras), se injertaron en tallos con 16 h luz (condiciones no inductoras), el resultado fue que las plantas produjeron tubérculos; en cambio, las hojas bajo condiciones no inductoras y el injerto bajo condiciones inductoras, no tuberizaron. La conclusión fue que las hojas son las responsables de activar el proceso de tuberización (Rodríguez-Falcón *et al.* 2006).

**2.4.2 Temperatura.** La tuberización se induce con bajas temperaturas, esto se encuentra relacionado con el fotoperiodo, debido a que el ambiente está menos expuesto a la radiación y se mantiene por menos tiempo al calor (Rodríguez-Falcón, 2006). Timlin *et al.* (2006) menciona que la temperatura alta (mayor a 30 °C) reduce la eficiencia de fotosistema II y se inhibe la enzima Rubisco; esto afecta la acumulación

de fotosintatos en los tubérculos y se favorece la demanda de otras partes de la planta. En experimentos previos se concluyó que a 30 °C tuvo efecto negativo en la tuberización debido al crecimiento de los estolones hacia arriba, produciendo más tallos aéreos; en cambio, cuando a los estolones se les proporciona un ambiente frío, comenzaron a tuberizar. Algunas evidencias apuntan que el efecto inhibitorio por temperaturas altas, es mediado por el ácido giberélico (GA), la presencia de GA<sub>3</sub> reduce la enzima que se encarga de sintetizar el almidón; la inhibición de la enzima que sintetiza el GA permitió la tuberización (Jackson, 1999). Las investigaciones han demostrado que las concentraciones de giberelinas en la planta, cambian la respuesta de la planta a las señales ambientales Mauseth (2003).

**2.4.3 Genotipo.** Algunas variedades silvestres están adaptadas a regiones ecuatoriales, donde el fotoperiodo permanece por 12 h y las temperaturas son bajas durante la noche (condiciones favorables para algunos genotipos); en cambio, no prosperan en ambientes templados o cálidos. Por ejemplo, las variedades chilenas se adaptan mejor a sitios con días más largos de las regiones templadas (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

**2.4.4 Niveles bajos de nitrógeno.** Se ha observado que los niveles elevados en N prolongan el crecimiento vegetativo; en cambio, una deficiencia provoca una senescencia prematura de las hojas (Giletto *et al.*, 2003). Una concentración alta de carbohidratos, en las hojas, en forma de azúcares o almidones, favorece la formación del tubérculo; mientras que los niveles altos de nitrógeno promueve el crecimiento de nuevas estructuras vegetativas y los carbohidratos disponibles en ese momento se

utilizan para el crecimiento de las partes vegetativas nuevas y se reduce la tuberización (Jackson, 1999).

## **2.5 Formación del tubérculo**

Los estolones experimentan cambios en sus patrones de división celular; en un principio las divisiones se observan en la región apical y sub-apical, como resultado de esto se alarga el estolón (crecimiento longitudinal). Al iniciarse la tuberización cesa la actividad mitótica de la zona apical y se forma una estructura llamada gancho donde comienza a acumularse proteínas y almidones, es en este sitio donde se formará la futura papa (Viola *et al.*, 2001) y se incrementa la expansión y actividad mitótica en sentido radial promoviendo el ensanchamiento del tubérculo (Figura 2). La piel de la papa forma una peridermis desde estadios muy tempranos; el felógeno se forma de divisiones periclinales de las células epidérmicas, este meristemo secundario formará el súber o corcho de la piel, dándole al tubérculo una apariencia áspera en la superficie (Salas *et al.*, 2003).

## **2.6 Translocación de macromoléculas durante la senescencia foliar**

Los órganos de la planta que producen carbohidratos como producto de la fotosíntesis se les denomina “fuente” y los sitios que atraen y acumulan los fotosintatos se les conocen como “demanda”; así la flor, el fruto, raíz y tubérculo se les consideran como órganos demanda (Mauseth, 2003). La distribución de los fotosintatos dentro de la planta está influenciado por el tamaño del órgano demanda (Tekaling y Hammes, 2005). Durante la senescencia foliar, las macromoléculas (lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos) se metabolizan a sus componentes básicos y se transportan

hacia sitios de demanda (Clark *et al.*, 2004) o se movilizan hacia los sitios de almacenamiento, como el tubérculo en desarrollo (Buchanan-Wollstone *et al.*, 2003).



Figura. 2. Estolón de la planta de papa previo a la tuberización. La flecha indica el gancho en el ápice, el sitio donde se formará la futura papa o tubérculo.

### **3 . O B J E T I V O S**

#### **Objetivo general**

Estudiar la relación entre la senescencia foliar y el llenado del tubérculo en dos variedades (Lupita y Tollocan) de papa (*Solanum tuberosum* L.) con diferente ciclo biológico.

#### **Objetivos específicos**

Estudiar la senescencia foliar de las var. Lupita y Tollocan, evaluando el verdor relativo, pigmentos fotosintéticos, contenido de proteínas solubles totales y abundancia relativa de la subunidad grande de la Rubisco (LSU)

Estudiar los componentes del rendimiento (peso fresco y seco del tubérculo, biomasa aérea y número de tubérculos por planta) y contenido de almidón durante la senescencia y llenado del tubérculo en las variedades de papa Lupita y Tollocan.

Relacionar la senescencia foliar con el llenado del tubérculo y los componentes del rendimiento de la var. temprana Lupita y la var. intermedia Tollocan.

#### **4 . H I P Ó T E S I S**

Las dos variedades Lupita y Tollocan, con diferente ciclo biológico, tienen patrones de senescencia foliar distintos que influyen en el llenado del tubérculo.

La variedad Lupita llena el tubérculo en un tiempo menor que la variedad Tollocan, respuesta relacionada con un mayor contenido de pigmentos fotosintéticos y de la LSU de la Rubisco.

## **5 . M A T E R I A L E S Y M É T O D O S**

### **5.1. Obtención de plantas**

Se trabajaron con dos variedades de papa con diferente ciclo biológico. La variedad Lupita de ciclo corto tarda aproximadamente 72 DDS en completar su ciclo; es una variedad con tubérculos de piel roja, creada en México y liberada en 1980. La var. Tollocan, es de ciclo intermedio, que oscila entre 90 y 120 DDS, el tubérculo es de piel amarilla (Rivera, 2008). El material fue proporcionado por el Programa Nacional de Papa del INIFAP-Metepec, estado de México, por el fitomejorador Ing. Victor Magallanes González.

Se sembraron semillas-tubérculo el 1º de septiembre del 2008, en macetas de 15 cm de diámetro con una capacidad de 1.5 L. El medio de soporte fue tierra de la localidad de Atocpan, Estado de México. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, éstas se fertilizaron cada 15 días con mezcla papera (170 N, 210 P, 170 K), la solución se preparó con 200 g de fertilizante en 20 L de agua. Las plantas de 30 DDS se colocaron en invernaderos del Programa Nacional de Papa, Metepec Toluca. Un total de 20 plantas (repeticiones) de cada variedad se colocaron en un diseño completamente aleatorio en un invernadero del Programa Nacional de Papa, Metepec, Estado de México. Las plantas se regaron con agua corriente cada tercer día. Un promedio de cinco plantas por variedad se muestrearon a los 50, 72 y 93 DDS.

### **5.2 Rendimiento biológico y agronómico**

El rendimiento biológico también conocido como biomasa de la parte aérea es el peso seco total de la planta (Escalante y Kojashi, 1993). En el caso de la papa, el rendimiento agronómico es el peso fresco del tubérculo por planta. En cada fecha de



cosecha se obtuvieron los tubérculos por planta de cada variedad y se midieron los pesos frescos de cada uno de los tubérculos.

En cada fecha de cosecha (50, 72 y 93 DDS) las partes (tallos, peciolo, lámina, tubérculo) de la planta se separaron. Los componentes aéreos (tallos, peciolo, lámina) se mantuvieron en una estufa a 70 °C, durante 72 h hasta obtener peso seco constante. Las muestras se pesaron en una balanza digital de precisión (Pionner Ohaus PA 313). En el caso del tubérculo, se midió el peso fresco por planta en una balanza de precisión (Pionner Ohaus PA 313), luego se rebanaron y secaron en una estufa de doble circulación hasta obtener peso constante.

La tasa relativa de crecimiento del tubérculo (TCT) se calculó de acuerdo con la fórmula de Tekaling y Hammes (2005).

$$TCT = \frac{1}{AS} \frac{(T2 - T1)}{(t2 - t1)}$$

Donde: AS es el área de siembra expresado en m<sup>2</sup>, T2 y T1 es el peso seco de los tubérculos en el tiempo uno (t1) y tiempo dos (t2) a la cosecha del tubérculo.

### **5.3 Índice de área foliar (IAF)**

Para la medición del área foliar se adecuó el método indirecto de trazado del contorno de las hojas en papel ordinario, recorte y pesada (Escalante, 1993) y modificado posteriormente por Sánchez-Bernal *et al.* (2008). Se trazaron diez cuadrados de 9 cm<sup>2</sup> de lámina foliar de cada variedad, sumando en total 90 cm<sup>2</sup>. Los cuadrados se dejaron secar en la estufa hasta peso constante. Después se sumaron los pesos secos de los diez cuadrados por variedad y con este resultado se realizó la relación de peso seco de la lámina por el área conocida de la lámina (90 cm<sup>2</sup>). En cada

fecha de cosecha se obtuvo el peso seco de la lámina por variedad. Para calcular el IAF se usó de la siguiente fórmula:

$$IAF = \frac{(\text{área foliar por planta})(\text{densidad de población en el área de siembra})}{\text{área de siembra}}$$

#### **5.4 Índice de cosecha**

La variable de índice de cosecha (IC) se determinó con la fórmula de acuerdo con Escalante y Kohashi (1993).

$$IC = \frac{\text{Peso seco del tubérculo}}{\text{Biomasa}}$$

#### **5.5 Cuantificación de almidón**

Esta variable se midió a los 50, 72 y 93 DDS. Para obtener una mezcla homogénea de cada repetición se tomaron submuestras de todos los tubérculos de la planta. Se pesaron 200 mg de tejido y se maceraron en 10 mL de alcohol etílico 80%. El macerado se colocó en un tubo de 50 mL con tapa y se mantuvo en baño maría por 20 min; se eliminó el exceso de etanol y se agregaron 2 mL de HCl 1N luego el tubo se calentó hasta ebullición (98°C) en una cama de arena de cuarzo durante 60 min, luego se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada. El extracto se filtró con papel Waltman (No. 1). Para determinar la concentración de glucosa se construyó una curva estándar usando una solución de glucosa (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Se elaboró una curva patrón con cinco concentraciones de glucosa (0, 40, 80, 120 y 160  $\mu\text{g}$ ), en cada tubo se agregaron 4 mL de la solución de antrona (0.2%) en ácido sulfúrico concentrado y el resto con agua desionizada para dar un volumen final de 5 mL. Se dejó incubar por 5 min y se midió la absorbancia a 620 nm (JENWAY, 6405). Para calcular la cantidad de almidón se usó un factor de corrección de 0.95. La molécula de glucosa tiene un peso

de 180 g/mol y la suma de dos moléculas es 360 g/mol, durante la unión de dos moléculas de glucosa se desprende una molécula de agua (18 g/mol) entonces la molécula sintetizada tiene un peso de 342 g/mol, así el factor de corrección queda de la siguiente manera  $342/360=0.95$ .

## 5.6 Pigmentos fotosintéticos

**5.6.1 Cuantificación química de clorofila.** Se extrajo un disco (1 cm diámetro) de tejido foliar fresco, con ayuda de un sacabocados. El disco se pesó en una balanza de precisión (Pionner Ohaus PA 313) y se maceró con 2 mL de acetona 80%, luego se vació en un tubo graduado de 15 mL y se llevó a 4 mL con acetona 80%, se centrifugó a 840 g durante 3 min y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron lecturas a 470, 646 y 663 nm en un espectrofotómetro (JENWAY, 6405). Se calculó el contenido de la clorofila a (Chl *a*) clorofila b (Chl *b*) xantofilas y carotenoides (x+c) de acuerdo con las fórmulas de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Los resultados se expresan en mg mL<sup>-1</sup> de extracto y posteriormente se calculó la clorofila en función de su peso fresco (PF) ( $\mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ).

$$\text{Chl}_a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Chl}_b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$x+c = 1000 A_{470} - 3.27 C_a - 107 C_b$$

---

229

**5.6.2 Medición relativa de clorofila (SPAD-meter).** El verdor de las hojas puede ser evaluado indirectamente en campo con un medidor relativo de clorofila (SPAD-meter, Minolta 502) (Figura 3A). Este instrumento proporciona unidades

arbitrarias usando la transmitancia de la luz de una hoja en el rango de absorción de las clorofilas (645 nm). Este instrumento requiere ser calibrado mediante la regresión entre los valores SPAD y su respectivo valor químico de pigmento ( $\mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ). De esta manera puede predecirse la concentración de pigmento para cada valor SPAD. Para el caso de la papa se tomaron discos (1 cm de diámetro) de hojas maduras (verdes) y con diferentes grados de senescencia (grados de amarillamiento) reflejados en unidades SPAD (0 a 43.9) de cada variedad. Se realizó la extracción y cuantificación química de los pigmentos fotosintéticos para la calibración del SPAD-meter; se tomaron 35 valores que representaron la gama de verdor, desde el verde (43 unidades SPAD), hasta el amarillo ( $< 1$  unidad SPAD) (3B, C, D). Con los resultados obtenidos se relacionó la concentración química de pigmentos con las unidades SPAD de la misma muestra. Mediante una regresión de los datos y se obtuvo la ecuación de la recta para cada variedad.

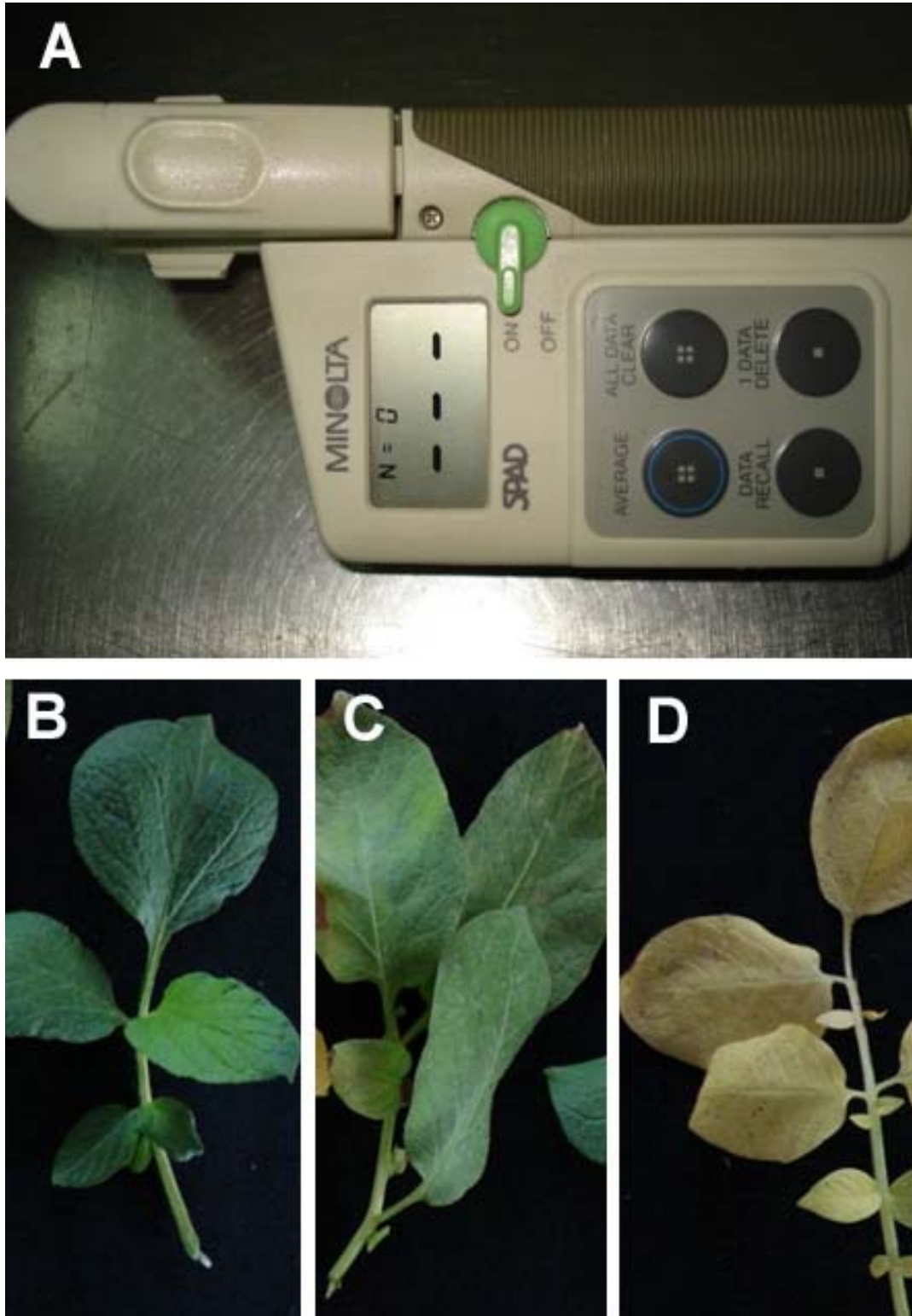


Figura 3. Medidor relativo de clorofila y diferentes grados de amarillamiento. A) Medidor de clorofila portátil SPAD-meter Minolta 502, B) hoja en estado verde (41 SPAD), C) hoja con senescencia temprana (23-26 SPAD) D) hoja con senescencia tardía (<5 SPAD). En B, C, D la var. fue Lupita.

**5.6.3 Monitoreo de la senescencia en toda la planta.** Se monitoreó el verdor de las todas las hojas de la planta a partir de los 40 DDS. Se realizaron lecturas periódicas (cada 10 días) hasta la marchitez de la planta, realizándose lecturas a los 40, 50, 60, 70, 80 y 90 DDS. En cinco plantas de cada variedad se midió el verdor foliar calculando el promedio de la lectura SPAD en la región basal, parte media y apical de cada lámina de todas las hojas en una planta.

## **5.7 Proteínas foliares**

**5.7.1 Extracción de proteínas solubles totales.** Se realizaron muestreos en hojas del quinto nudo; cinco repeticiones por variedad, a los 39, 50, 72 y 93 DDS. Se pesaron 150 mg de tejido fresco en una balanza precisión (Pionner Ohaus, PA 313). Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de procesarse. La extracción se realizó de acuerdo a Makino (1983). El tejido se maceró en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 12.5% glicerol, pH 7.5) y se centrifugó (Eppendorf, Minispin plus 120 VAC) a 13000 g por 10 min. El sobrenadante se uso para la cuantificación de proteínas solubles totales en el espectrómetro Nanodrop (Thermo scientific, NanoDrop Modelo 1000) según protocolo descrito por el fabricante. Este aparato calcula directamente la concentración de proteína en un 1  $\mu$ L de extracto sin necesidad de mayor procesamiento de la muestra. La lectura se realizó a 230 nm, que es la longitud de onda seleccionada para la lectura de proteínas soluble totales.

**5.7.2 SDS-PAGE para la LSU de la Rubisco.** Después de la extracción de las proteínas solubles, se tomaron 100  $\mu$ L del extracto y se mezclaron con 100  $\mu$ L de la solución amortiguadora (Tris-HCl 50 mM, 1% SDS, 2% de  $\beta$ -ME, 12.4% de glicerol,

pH 6.8). La muestra se puso a ebullición en un baño seco (Labnet, Digital Dry Bath D1100) por 5 min, luego se centrifugó a 8000 g (Eppendorf, Minispin plus 120 VAC) por 2 min a 20 °C, y se desechó el precipitado. El sobrenadante se utilizó para correr el gel SDS-PAGE. El gel resolutivo tuvo una concentración de poliacrilamida del 12% y el concentrador de 4%, éstos se prepararon de acuerdo por Laemmli (1970). Cada pozo en el gel se cargó con 40 µg de proteína. Se utilizó un marcador molecular de bajo rango (113, 93, 50, 35, 28 y 21 kDa, BioRad). Los geles se montaron en un sistema vertical (Mini-Protean II Bio-Rad) y se corrieron a 20 mA por 2 h con una fuente de poder (Power PAC 3000, BioRad). Se tiñeron con azul de Coomassie 0.1% preparado en etanol, agua y ácido acético (5:4:1). Los geles se destiñeron con una solución de agua, etanol y ácido acético (67:25:8), durante 30 min para eliminar el exceso de colorante.

Para calcular el tamaño de las proteínas reveladas en los geles, se midió el Rf de las mismas con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{dx}{dt}$$

Donde: dx= distancia que recorre la molécula de interés, dt= distancia total recorrida por el frente del gel. Posteriormente se graficó el Log del peso molecular de las moléculas conocidas (marcador) con la migración (Rf). De esta manera se obtuvo una gráfica en la cual se estimó el tamaño de las proteínas de las muestras.

## **5.8 Diseño experimental**

El diseño experimental fue de dos factores completamente aleatorio; un factor fueron las variedades utilizadas y el segundo fueron las diferentes fechas de muestreo. Las plantas, de las dos variedades, se distribuyeron de manera aleatoria en un bancal del invernadero, con cinco repeticiones. Se utilizó este diseño debido a que las unidades

experimentales eran homogéneas al igual que el sustrato en donde crecieron. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los datos de clorofila y se hizo una comparación de medias por medio de Duncan ( $p \leq 0.05$ ) usando el paquete estadístico SAS versión 9.0 Institute Inc. Cary, NC, U.S.A.



## 6 . R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N

**6.1 Rendimiento biológico y agronómico.** La var. Lupita produjo menos materia seca en la parte aérea, comparado con la var. Tollocan, el análisis estadístico mostró diferencia significativa ( $p=0.0001$ ) entre variedades. La materia seca de la var. Lupita disminuyó en el tiempo; a los 50 DDS la planta acumuló más materia seca en los tallos (Figura 4A), sin embargo, a los 72 y 93 DDS, la mayor cantidad se acumuló en la lámina foliar; esto es importante debido a que las hojas son los sitios donde se sintetizan la mayoría de los fotoasimilados que posteriormente serán enviados hacia las partes de almacenamiento (Aerts y Chapin, 2000). Durante la senescencia foliar algunos componentes de la hoja (proteínas y carbohidratos) se reciclan, contribuyendo al crecimiento del órgano demanda, que en este caso fue el tubérculo en crecimiento. Se menciona que los frutos son los principales órganos demanda, por ejemplo en los cítricos la sacarosa es el principal compuesto de transporte de carbono por vía floema; en los cereales la tasa fotosintética neta (70-80% que contribuye al desarrollo de los granos) es relativamente alta (Chen *et al.*, 2002); también se ha documentado que el fruto de *Lycopersicum esculentum* en crecimiento es una fuerte demanda de fotoasimilados, presentándose un patrón de crecimiento de tipo sigmoideal (Wang *et al.*, 1993). La Figura 4B muestra una tendencia de disminución en el contenido de materia seca durante la senescencia. En la literatura se menciona que las hojas palidecen antes de quedar totalmente senescentes, se vuelven más delgadas y cambia el ángulo de la hoja (Rodríguez-Falcon *et al.*, 2006).

En Tollocan la materia seca fue mayor en el follaje, esto es importante debido a que se invierte más energía en las hojas y tallos que en la var. Lupita, quizá porque su ciclo es más largo que Lupita. La acumulación de materia seca en el follaje de la var. Lupita fue menor, esto podría estar relacionado con un ciclo biológico más corto porque

tiene que canalizar los fotoasimilados al tubérculo. La Figura 4A y 4B muestran una diferencia en el contenido de materia seca entre las variedades. El análisis estadístico indica que existe una diferencia significativa entre ellas ( $p=0.0001$ ), la que menos acumula es la variedad de ciclo corto (2.05 g por planta) y la variedad que más acumula es la de ciclo intermedio (4.31 g por planta).

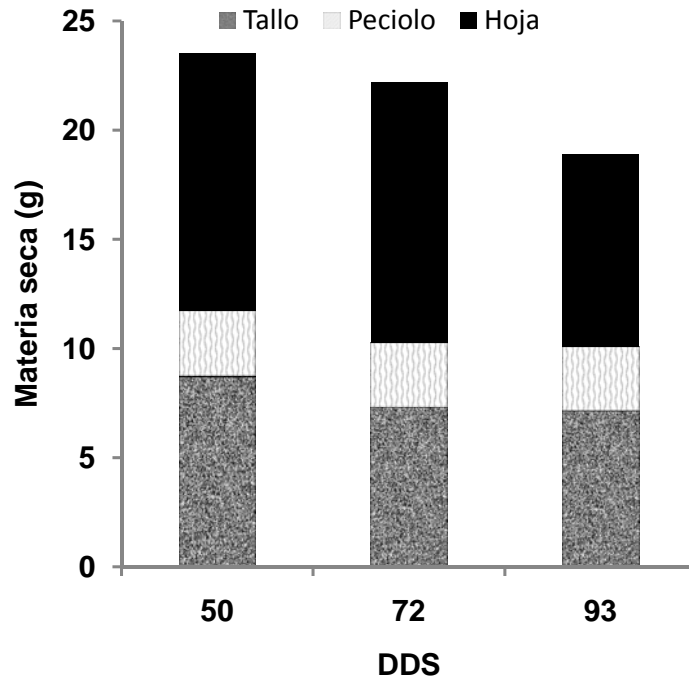
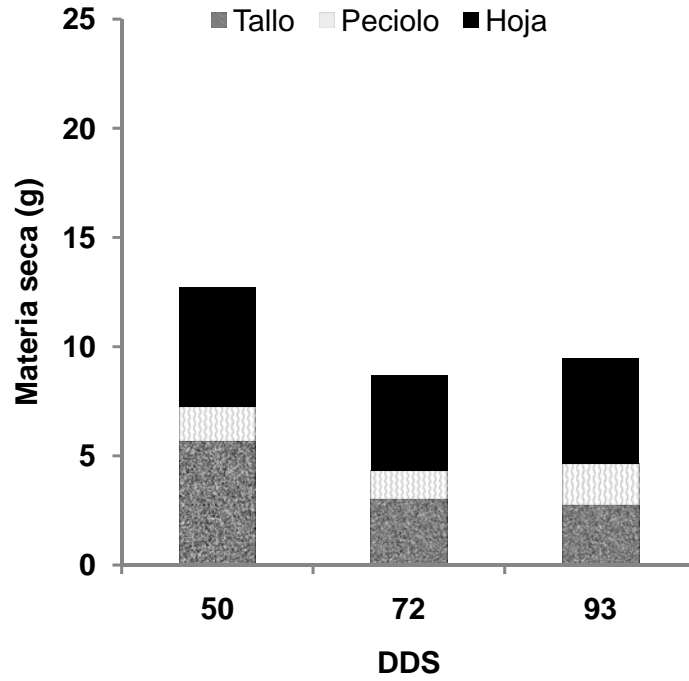


Figura 4. Distribución de materia seca por componente morfológico durante un ciclo de 93 días (n=5). A) var. Lupita, B) var. Tollocan.

El Cuadro 1 sintetiza las mediciones que se realizaron en los tubérculos muestreados. El número de tubérculos de la var. Tollocan fue similar a los 50 DDS y a los 93 DDS, esto muestra que la formación de todos los tubérculos se produjo durante los primeros 50 DDS y que posteriormente estos mismos sólo aumentaron de peso (Cuadro 1). En cuanto al peso fresco (PF) de los tubérculos, se observó que Tollocan los presentó más pesados que los de Lupita. La tendencia en las dos variedades fue a incrementar el PF hacia la última fecha de muestreo; en cambio, el peso seco presentó una tendencia diferente: en un principio la var. Lupita acumuló más materia seca en el tubérculo ( $5.86 \pm 0.49$  g) que la Tollocan ( $5.11 \pm 1.26$  g), sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ( $p=0.03$ ), sólo hasta los 93 DDS.

Los tubérculos de la var. Lupita a los 50 DDS tuvieron en promedio 20 mm de diámetro, menor al mostrado en la var. Tollocan (22 mm); a los 72 DDS los tubérculos de la var. Lupita tuvieron en promedio 26.4 mm de diámetro y la var. Tollocan 24.1 mm, en la última fecha de muestreo (93 DDS) en ambas variedades los tubérculo tuvieron un diámetro similar (31 mm) (Figura 5, 6 y 7). La TCT indica cuanto crece el órgano por día y por metro cuadrado de siembra. El Cuadro 1 muestra que la mayor TCT la presentó la var. Tollocan, en Lupita la TCT fue mayor a los 93 DDS. Tollocan acumuló más biomasa que Lupita, respuesta asociada a un ciclo biológico más largo.

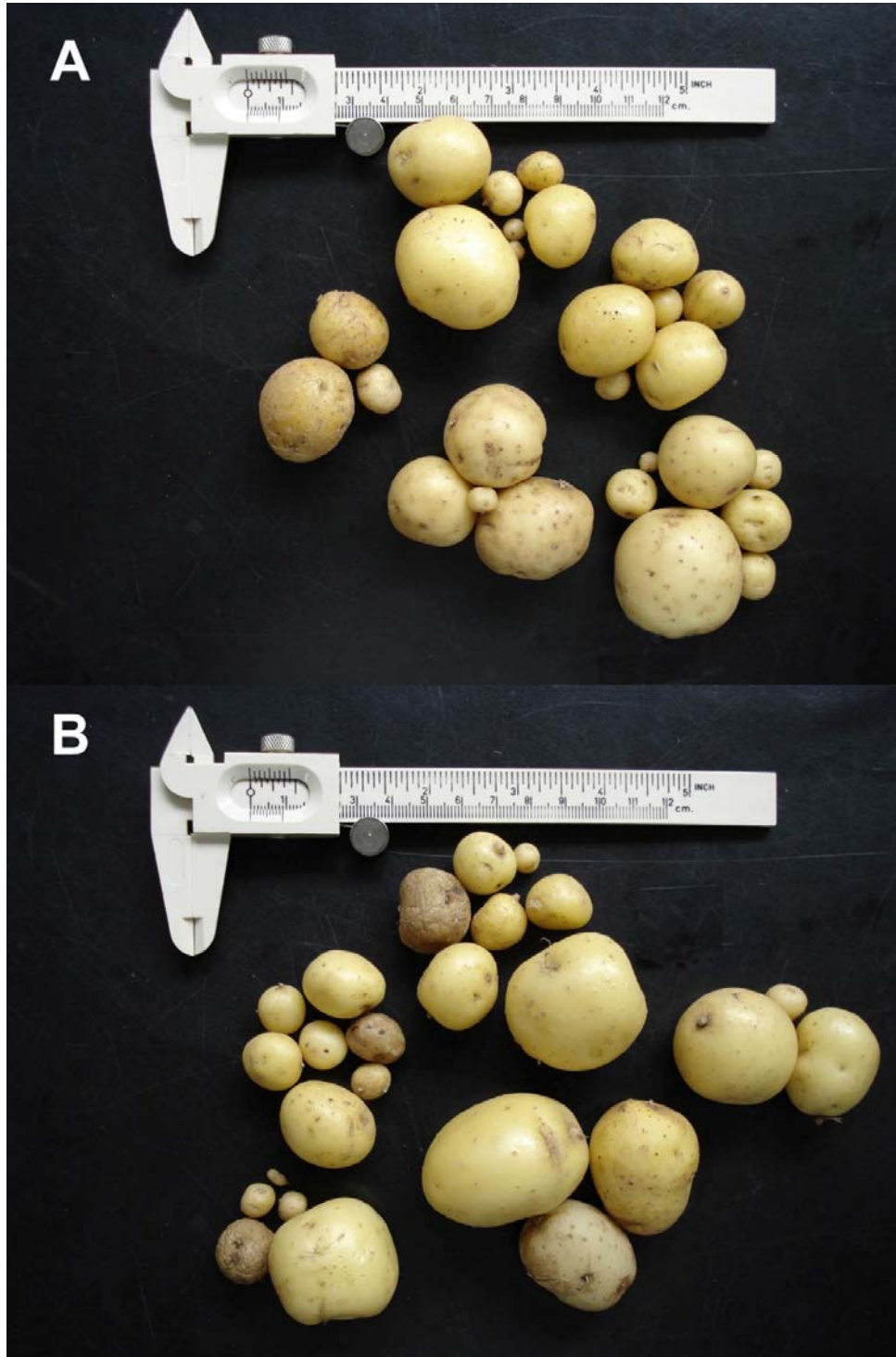


Figura 5. Tubérculos de 5 plantas del primer muestreo (50 DDS). A) var. Lupita, B) var. Tollocan.



Figura 6. Tubérculos de 5 plantas del primer muestreo (72 DDS). A) var. Lupita, B) var. Tollocan.

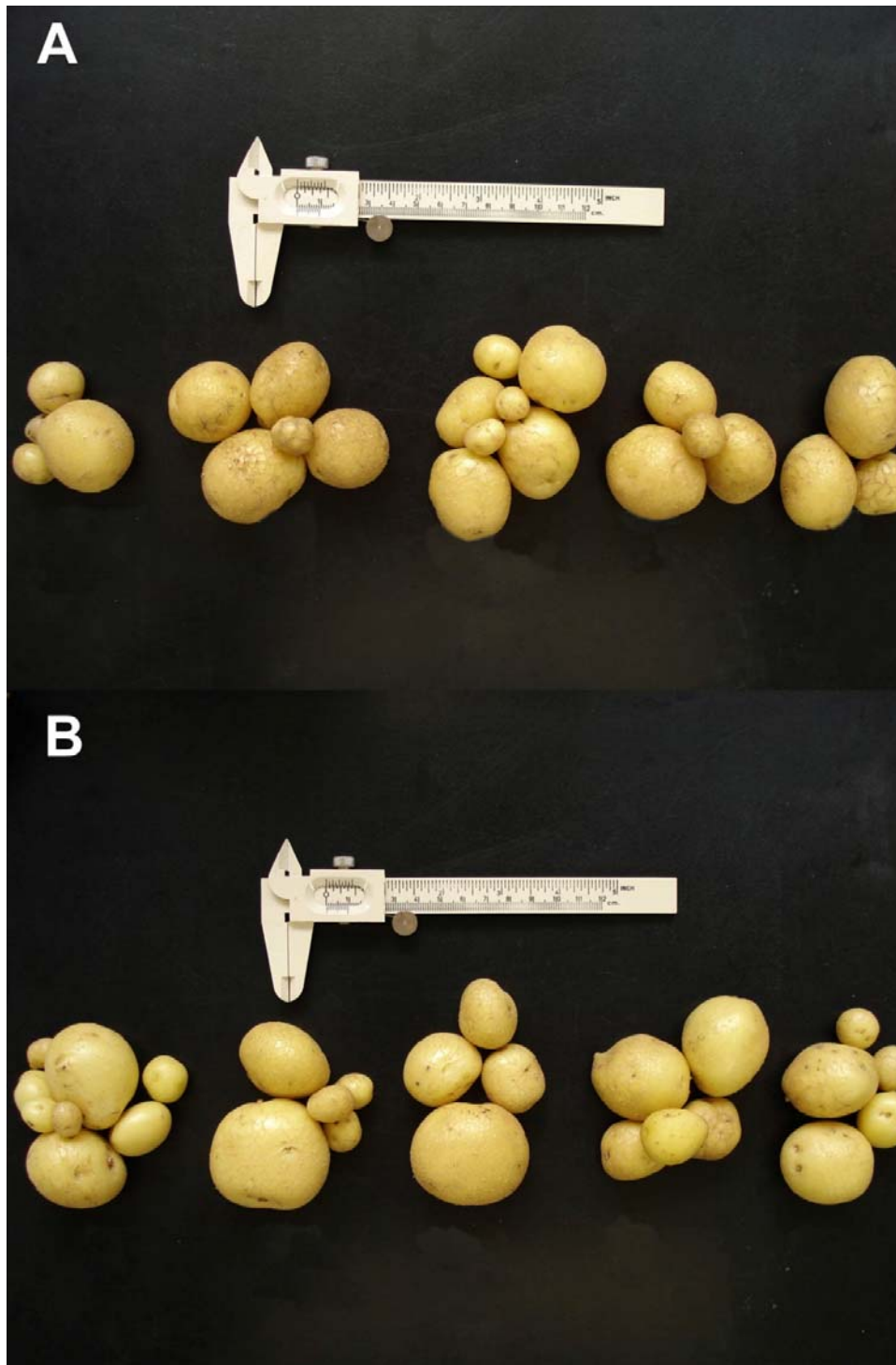


Figura 7. Tubérculos de 5 plantas cosechados a los 93 DDS. A) var. Lupita, B) var. Tollocan.

**Cuadro 1.** Aspectos fisiotécnicos de la var. Lupita (*Solanum tuberosum* L.) durante un ciclo de cultivo.

| DDS | NT <sub>‡</sub> | PFT<br>(g) †           | PST<br>(g) †           | PSTTotal<br>(g) | TCT<br>(g m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> ) | Peso seco de<br>la parte aérea<br>(g) | Biomasa<br>promedio<br>(g) † | Biomasa Total<br>(g) |
|-----|-----------------|------------------------|------------------------|-----------------|---|---------------------------------------|------------------------------|----------------------|
| 50  | 7               | 31.12 ± 4.35 <b>a</b>  | 5.86 ± 0.49 <b>a</b>   | 29.28           | 0.66  | 12.7                                  | 8.40 ± 0.49 <b>a</b>         | 41.98                |
| 72  | 5               | 43.90 ± 10.20 <b>a</b> | 7.71 ± 1.75 <b>a</b>   | 38.57           | 0.48  | 8.7                                   | 9.45 ± 2.02 <b>a</b>         | 47.28                |
| 93  | 4               | 63.17 ± 9.49 <b>ab</b> | 11.28 ± 1.90 <b>ab</b> | 56.40           | 0.96  | 9.5                                   | 13.17 ± 2.27 <b>ab</b>       | 65.86                |

† Los datos son promedios más menos ES, (n=5). Medias con diferente letra en las columnas son estadísticamente diferentes (P< 0.05).

‡ Se usó la mediana para obtener este valor.

DDS = días después de la siembra; NT = número de tubérculos por planta; PFT = peso fresco del tubérculo; PST = peso seco de los tubérculos por planta; PSTTotal= peso seco del tubérculo total; TCT = tasa de crecimiento del tubérculo.



**Cuadro 2.** Aspectos fisiotécnicos de la var. Tollocan (*Solanum tuberosum* L.) durante un ciclo de cultivo.

| DDS | NT <sub>‡</sub> | PFT<br>(g) †            | PST<br>(g) †           | PSTTotal<br>(g) | TCT<br>(g m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> ) | Peso seco de<br>la parte aérea<br>(g) | Biomasa<br>promedio<br>(g) † | Biomasa Total<br>(g) |
|-----|-----------------|-------------------------|------------------------|-----------------|---|---------------------------------------|------------------------------|----------------------|
| 50  | 5               | 36.41 ± 7.49 <b>a</b>   | 5.12 ± 1.26 <b>a</b>   | 25.55           | 0.58  | 23.5                                  | 9.82 ± 1.26 <b>a</b>         | 49.10                |
| 72  | 6               | 59.93 ± 11.42 <b>ab</b> | 11.09 ± 2.07 <b>ab</b> | 55.44           | 1.54  | 22.2                                  | 15.53 ± 2.55 <b>ab</b>       | 77.65                |
| 93  | 5               | 82.16 ± 4.19 <b>b</b>   | 16.72 ± 0.92 <b>b</b>  | 83.58           | 1.52  | 18.9                                  | 20.50 ± 0.92 <b>b</b>        | 102.51               |

†Los datos son promedios más menos E.S. (n=5), medias con diferente letra en los DDS son estadísticamente diferentes (P< 0.05).

‡Se usó la mediana para obtener este valor.

DDS = Días después de la siembra; NT = número de tubérculos por planta; PFT = peso fresco del tubérculo; PST = peso seco de los tubérculos por planta; PSTTotal= peso seco del tubérculo total; TCT = tasa de crecimiento del tubérculo.

Los resultados de la Figura 8, muestra la razón de la materia seca de los tubérculos entre la cantidad de materia seca de la parte aérea. Cabe señalar que la var. Lupita presentó mayor razón de peso (cantidad de materia seca del tubérculo contenido en la parte aérea) comparada con Tollocan, esta relación señala la capacidad que tiene la planta para formar el tubérculo, cuando la razón es mayor significa que la planta tiene mayor capacidad para acumular materia que en este caso fue el tubérculo.

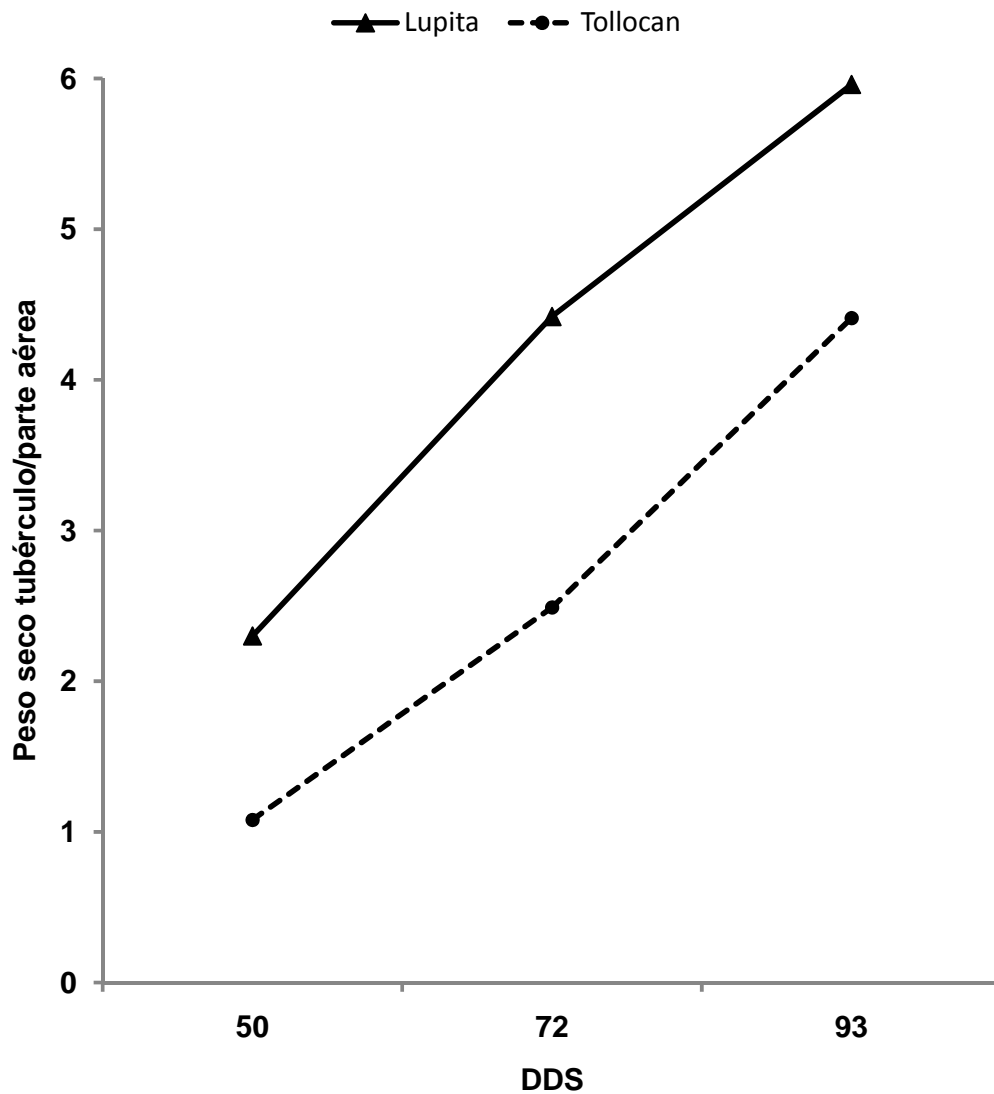


Figura 8. Razón del peso seco del tubérculo entre peso seco de la parte aérea de las variedades Lupita y Tollocan.

**6.2 Índice de área foliar.** El índice de área foliar (IAF) representa el área de las láminas de todas las plantas que ocupan una determinada superficie de terreno. En el presente trabajo se realizaron tres muestreos destructivos (50, 72 y 93 DDS). La var. Lupita presentó menor IAF que la var. Tollocan, por lo que Lupita necesitó menos hojas para el llenado del tubérculo ó tuberización; a los 50 DDS presentó un IAF alto (3.47), posteriormente este índice bajó, debido a que las hojas senescieron rápidamente e incluso algunas de ellas cayeron de la planta. Esta tendencia puede estar relacionada con el llenado del tubérculo (aproximadamente a los 70 DDS se realiza la cosecha del tubérculo) que coincide con la senescencia, la disminución del IAF y la translocación de los fotosintatos. En cambio, la var. Tollocan presentó un IAF mayor en las tres fechas de muestreo con respecto de Lupita, el mayor índice que alcanzó fue a los 72 DDS (7.61), mientras que a los 93 DDS las hojas senecieron y el IAF fue el menor de los tres encontrados (Figura 9). Este índice indica el potencial fotosintético de la planta en un momento dado del desarrollo (Escalante y Kohashi, 1993). En el presente estudio se demostró la relación que existe entre la abundancia del follaje representada por el IAF y el ciclo biológico de la variedad, la cual responde a las necesidades particulares de cada variedad durante el llenado del tubérculo.

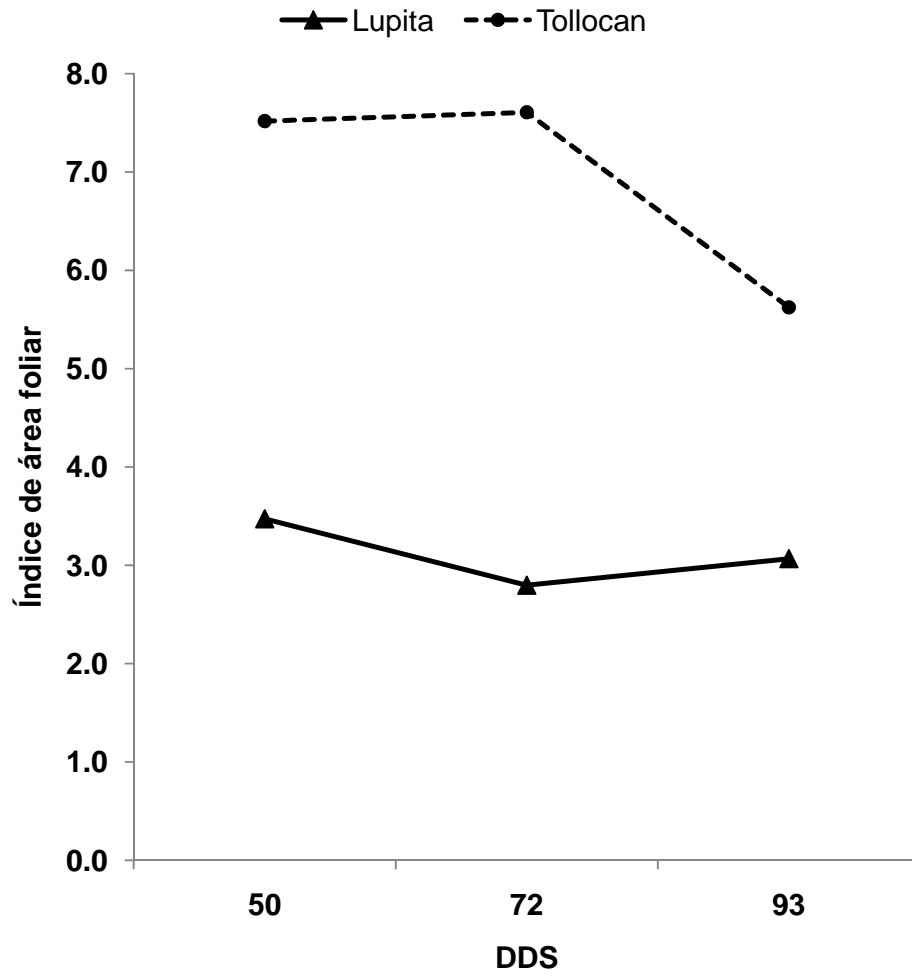


Figura 9. Índice de área foliar (IAF) de las variedades Lupita y Tollocan en diferentes fechas de muestreo (DDS).

**6.3 Índice de cosecha.** Este dato es un indicador de la eficiencia que tiene la planta para acumular mayor cantidad de materia seca en el órgano de interés, en este caso es el tubérculo (papa) (Vos, 1997). Entre mayor sea el índice es más eficiente la planta para acumular materia en el órgano de interés, la escala se expresa en valores fraccionarios o porcentuales (Escalante y Kohashi, 1993).

Los resultados del índice de cosecha de las variedades estudiadas se muestran en el Cuadro 3. En la var. Lupita el índice de cosecha fue mayor que la var. Tollocan. La variedad de ciclo corto (Lupita) alcanzó el índice de cosecha (72 DDS) reportado para la especie *S. tuberosum* (Aguilar *et al.*, 2006); aunque a los 93 DDS se observó un pequeño aumento en el peso, pero no significativo. En cambio, en la var. Tollocan el peso se incrementó de manera gradual, esto estaría de acuerdo con el ciclo biológico (120 DDS) más largo para esta variedad. Entre los 50 y 72 DDS el peso se incrementó significativamente alcanzando su máximo a los 93 DDS. Considerando que el índice de cosecha es un reflejo de la eficiencia de la planta para acumular fotosintatos, estos resultados muestran que las var. Lupita y Tollocan se comportaron de acuerdo con su ciclo biológico marcado por los fitomejoradores y que se refleja en el llenado del tubérculo (órgano de interés), así aunque la planta siga viva como se demuestran los resultados de Lupita hasta los 93 DDS.

Cuadro 3. Índice de cosecha (IC) en dos variedades con diferente ciclo biológico, Lupita (corto) y Tollocan (intermedio).

| <b>DDS</b> | <b>Lupita</b> | <b>Tollocan</b> |
|------------|---------------|-----------------|
|            | <b>IC</b>     | <b>IC</b>       |
| <b>50</b>  | <b>0.69</b>   | <b>0.52</b>     |
| <b>72</b>  | <b>0.82</b>   | <b>0.71</b>     |
| <b>93</b>  | <b>0.85</b>   | <b>0.81</b>     |

DDS, días después de la siembra; IC, índice de cosecha.

## 6.4 Cuantificación de almidones

El mayor contenido de almidones lo presentó la var. Tollocan ( $8.25 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ ), la cual presentó una tendencia de incremento continuo a lo largo del ciclo. En Lupita se observó que en un inicio (50 DDS) el contenido de almidón fue de  $7.3 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ , pero luego disminuyó, llegando a una concentración de  $4.87 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ . Los análisis estadísticos señalan no diferencias ( $p \leq 0.05$ ) entre las variedades, pero sí hay diferencias entre fechas de colecta (Figura 10). En el caso de la var. Lupita se muestra que el contenido de almidón es menor al aumentar el número de días después de la siembra, en contraste el peso fresco del tubérculo aumenta el día 93, esto indica que la papa acumula más agua y también aumenta el volumen (Figura 10A). En la var. Tollocan la relación es distinta, el contenido de almidón fue casi el mismo desde el día 50 ( $7.85 \mu\text{g} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ ) comparado con el día 93 ( $8.25 \mu\text{g} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ ). Con respecto al peso fresco del tubérculo éste aumentó hacia el final del ciclo de manera significativa en ambas variedades (Figura 10B).

## 6.5 Pigmentos fotosintéticos

**6.5.1 Calibración del SPAD-meter.** La curva de calibración para cada una de las variedades fue importante porque con ella se pudo estimar de manera indirecta, la concentración de la clorofila total ( $\mu\text{g Chl mg PF}^{-1}$ ) y así monitorear la senescencia de la misma planta durante su ciclo biológico, las Figuras 11 y 12 muestran la relación entre el SPAD y la concentración de clorofila total ( $\mu\text{g Chl mg PF}^{-1}$ ), de esta forma se obtuvo la ecuación de la regresión correspondiente para cada variedad. La var. Lupita y Tollocan mostraron una relación exponencial con una  $R^2 = 0.93$  en Lupita (Figura 11) y  $R^2 = 0.93$  en la var. Tollocan (Figura 12).

También se obtuvo la gráfica para las xantofilas y carotenoides (x+c) con sus respectivas ecuaciones y  $R^2$ , para los fines de este trabajo no se evaluaron en el tiempo estas variables, como en el caso de las clorofilas. Las gráficas muestran que la var. Lupita presentó mayor contenido de x+c ( $0.74 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ ) que Tollocan ( $0.38 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ ). Se muestra que la concentración de x+c disminuye de manera exponencial en la var. Lupita (Figura 13) mientras que en la var. Tollocan el comportamiento es de tipo potencial (Figura 14). En hojas de trigo (*Triticum aestivum*) se observó que la concentración de estos pigmentos disminuyó con el tiempo, en dichas plantas se presentó un valor máximo de  $34 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  (González *et al.* 2009) y  $37 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  (Zavaleta-Mancera *et al.* 2007). Los pigmentos accesorios (x+c) son importantes debido a que participan en la absorción de la luz durante la fotosíntesis (Sheeler, 1993) y protegen de las clorofilas por destrucción oxidativa por el oxígeno cuando los niveles de irradiación son elevados (Salisbury, 1994), en la senescencia tendrían un efecto protector para que las células no sean dañadas por el exceso de la radiación, debido a que cada vez tienen menos clorofila mientras envejece, o por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se acumulan durante la senescencia cuando ocurre la peroxidación de los lípidos (Bhattacharjee, 2005). Los resultados del presente trabajo mostraron que la var. Lupita tiene mayor contenido de estos accesorios fotosintéticos y por lo tanto una mejor protección durante la senescencia que la var. Tollocan.



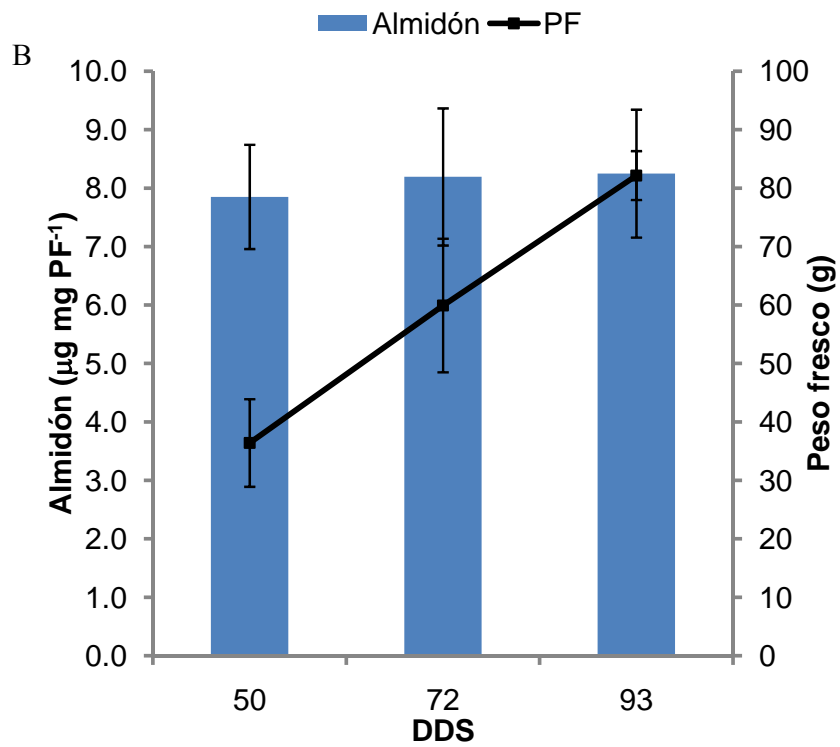
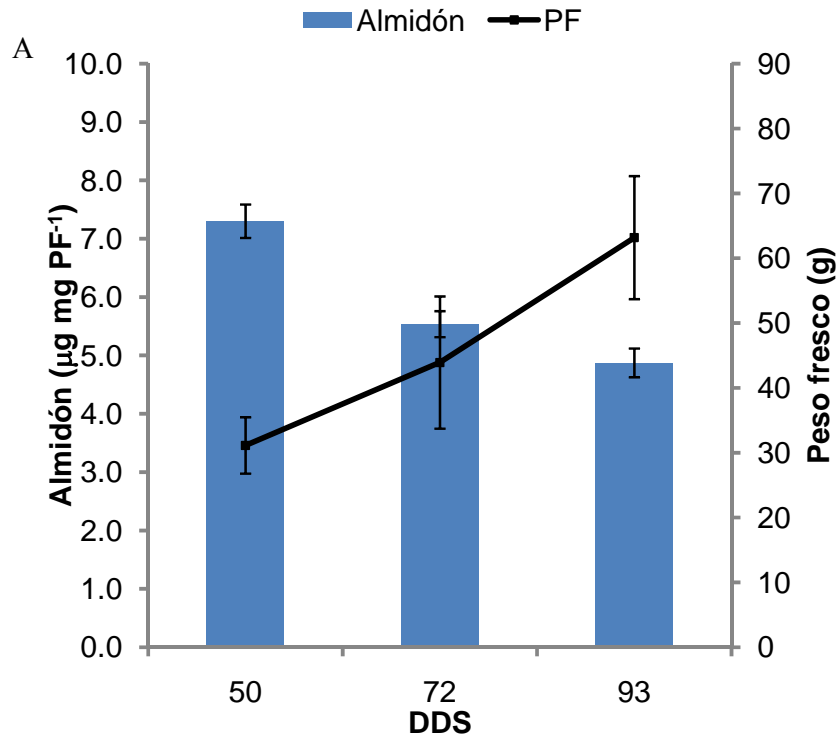


Figura 10. Relación entre la cantidad de almidón y el peso fresco de la papa, durante los tres muestreos realizados A) var. Lupita, B) var. Tollocan.

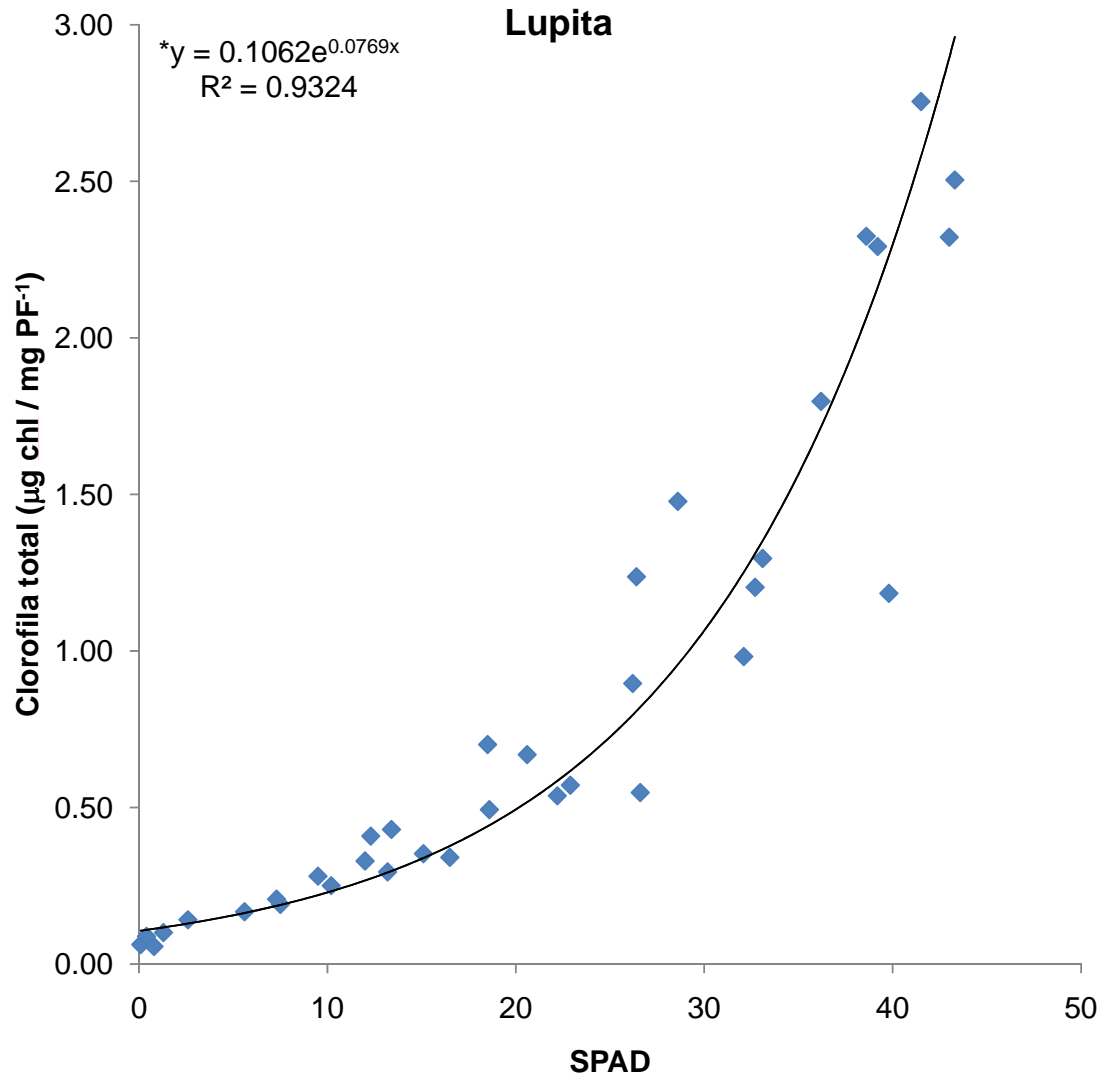


Figura 11. Relación SPAD y concentración de clorofila total de las hojas de la var. Lupita (ciclo corto) durante la senescencia. La regresión sigue un comportamiento exponencial expresado en la ecuación (\*) con un  $R^2=0.93$ .

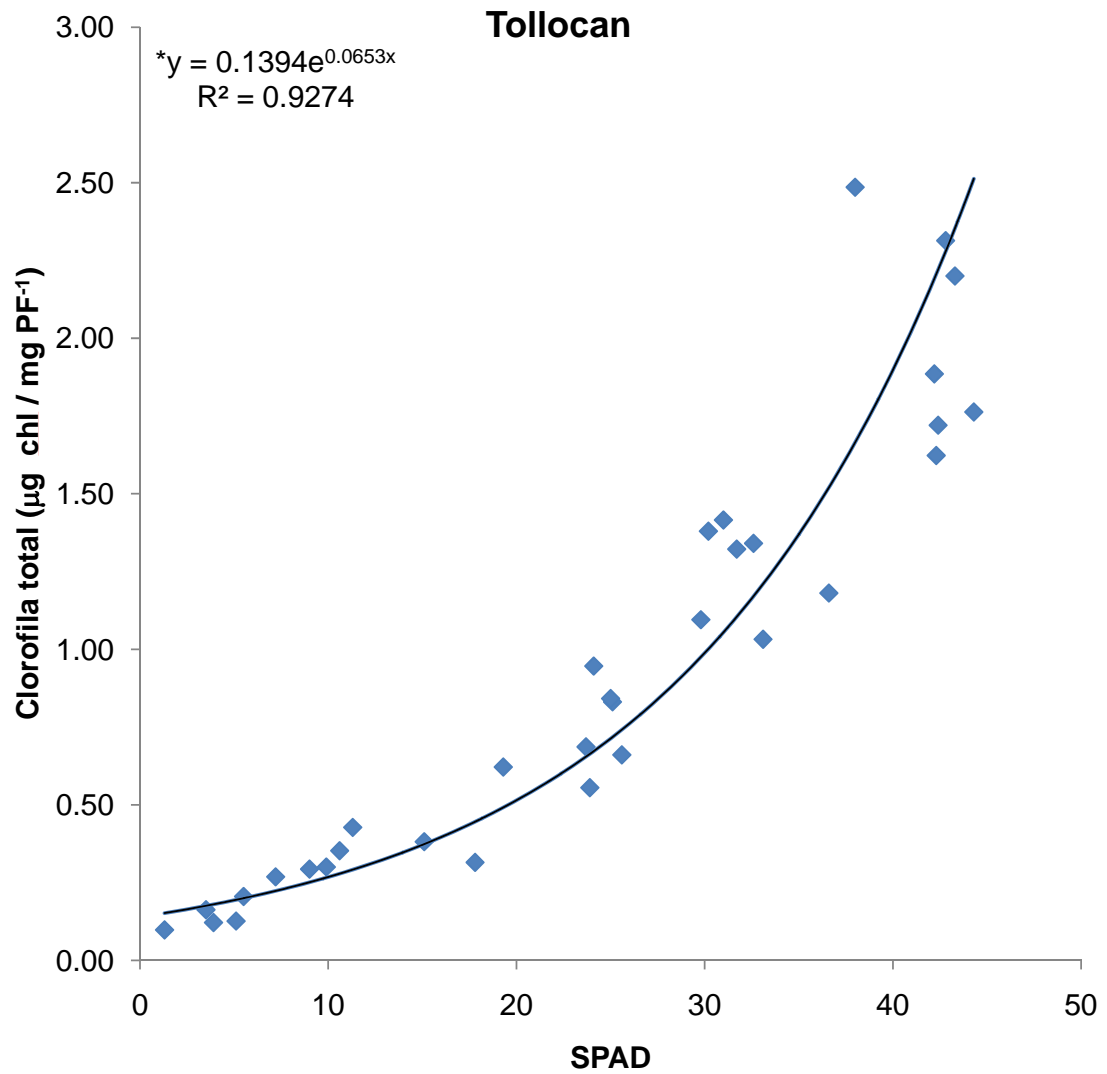


Figura 12. Relación SPAD y concentración de clorofila total de las hojas de la var. Lupita (ciclo corto) durante la senescencia. La regresión sigue un comportamiento exponencial expresado en la ecuación (\*) con un R<sup>2</sup>=0.93.

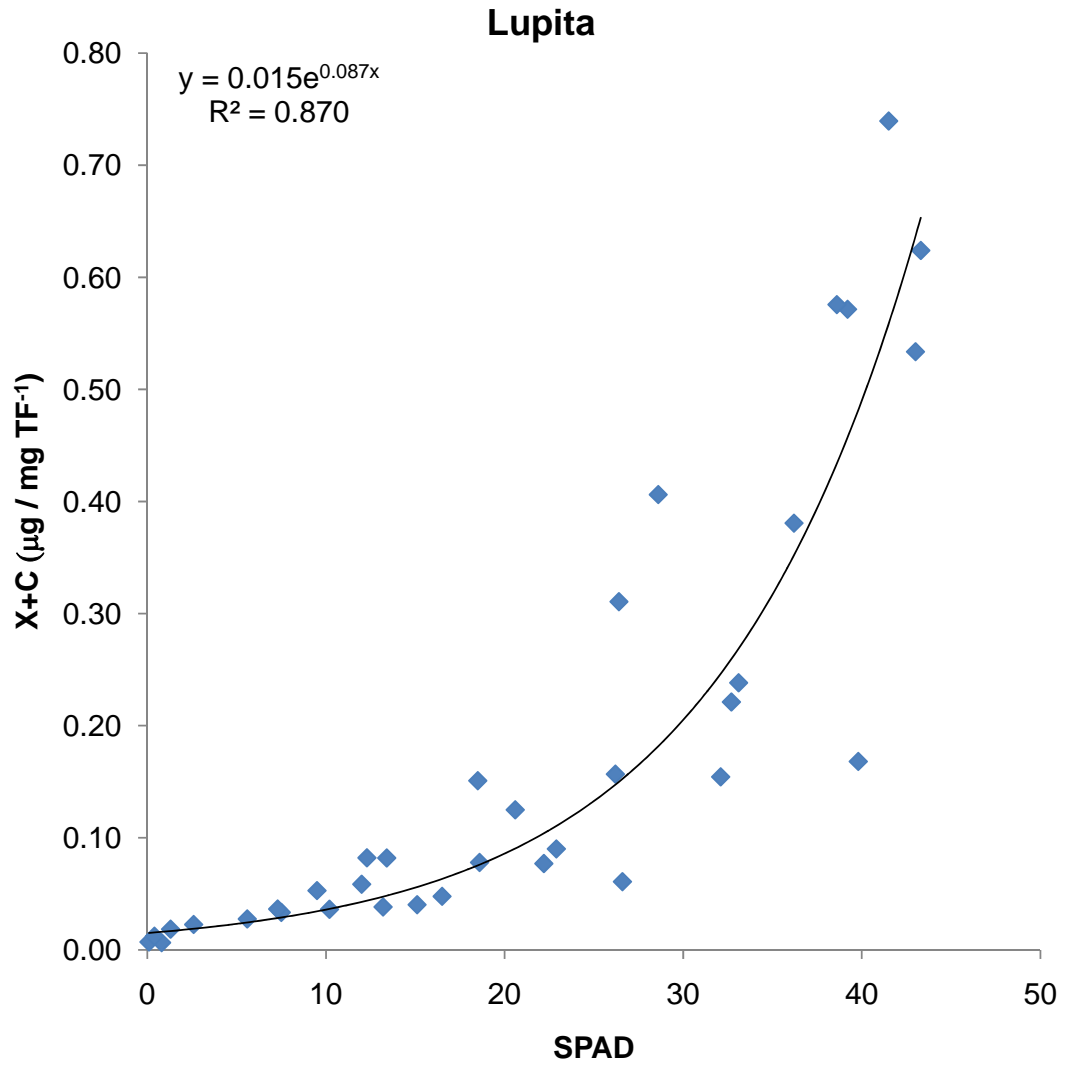


Figura 13. Relación SPAD y concentración de xantofilas y carotenoides de las hojas de la var. Lupita (ciclo corto) durante la senescencia. La regresión sigue un comportamiento exponencial expresado en la ecuación (\*) con un  $R^2=0.87$ .

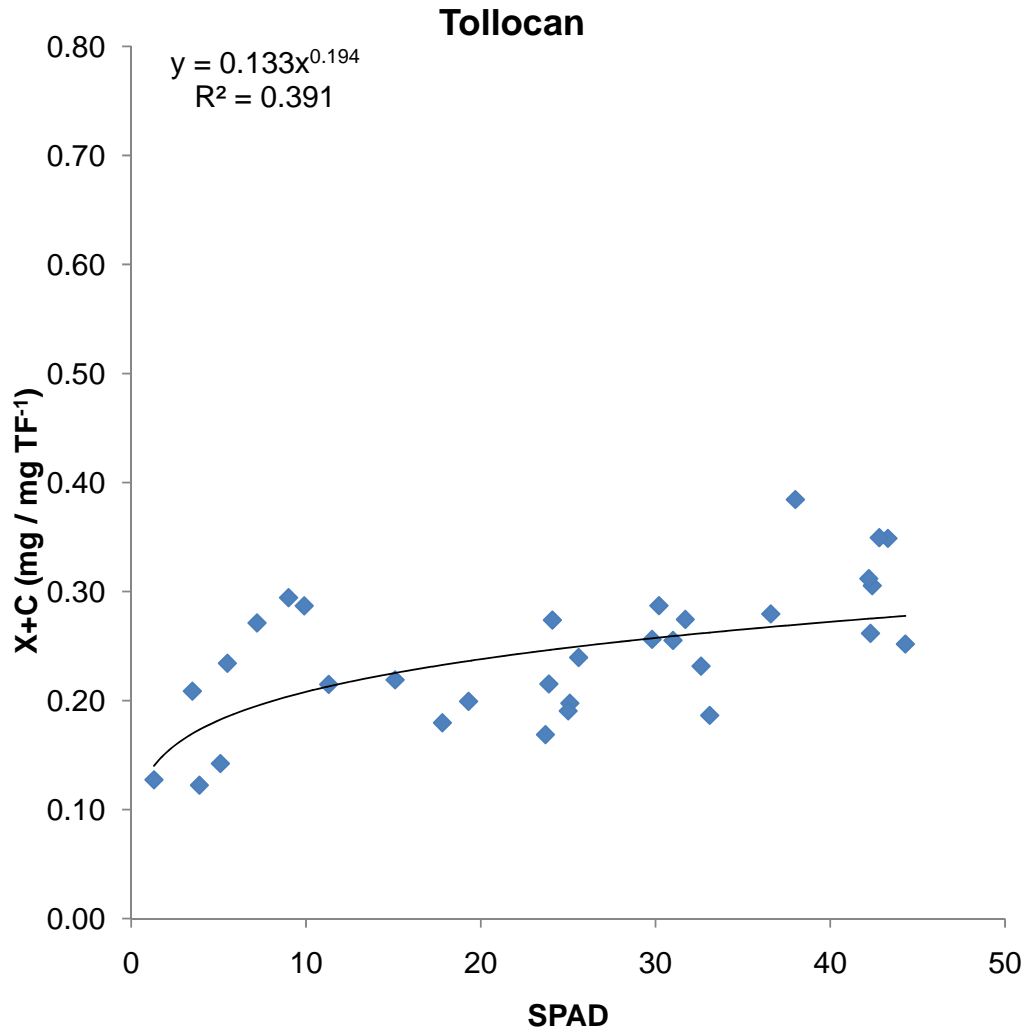


Figura 14. Relación SPAD y concentración de xantofilas y carotenoides de las hojas de la var. Tollocan (ciclo intermedio) durante la senescencia. La regresión sigue un comportamiento potencial expresado en la ecuación (\*) con un  $R^2=0.33$ .

**6.5.2. Senescencia de toda la planta.** Los resultados del monitoreo muestran que las dos variedades perdieron clorofila (Figura 15); sin embargo, en la var. Lupita se observó una disminución más pronunciada y rápida que la var. Tollocan a los 50 DDS, el análisis estadístico y la comparación de las medias indicó que entre los días 40 y 50 se presentaron diferencias en el contenido de clorofila en las dos variedades; esto demuestra que en ese periodo las hojas se encontraban translocando los productos de degradación de la clorofila y proteína cloroplástica (Quirino *et al.*, 2000) así como carbohidratos estructurales por vía floema a partes de demanda (tubérculo en crecimiento) (Jackson, 1999); en caso contrario, la degradación se daría más rápido en los últimos 20 días del ciclo de ambas variedades, donde se mostraban ya síntomas de senescencia foliar (amarillamiento de la hoja) (observaciones en invernadero).

El tubérculo en crecimiento es un punto de demanda importante que atrae los fotoasimilados y los productos de degradación celular durante la senescencia foliar. La var. Lupita pierde más rápido los pigmentos fotosintéticos (Figura 15), lo cual es indicio del dismantelamiento del cloroplasto (Hopkins *et al.*, 2007), esto se debe a una necesidad temprana (50 DDS) para el llenado del tubérculo este patrón concuerda con la cosecha temprana del mismo que ocurre aproximadamente a los 70 DDS en el Valle de Toluca (comunicación personal Ing. Víctor Magallenes).

Por el contrario la var. Tollocan presenta una disminución gradual de pigmentos, indicadores de una senescencia más lenta en comparación con Lupita, reflejo de un llenado paulatino del tubérculo, de ciclo más largo que la var. Lupita, por lo que esta tendencia corresponde al ciclo intermedio típico de Tollocan y una cosecha posterior a la var. Lupita.

La Figura 16 muestra la relación de la clorofila total y el peso seco del tubérculo. La var. Lupita al contar con menos área foliar transloca la mayor cantidad de

fotoasimilados y productos de degradación y los dirige hacia el tubérculo, esta relación indica que la planta aprovecha estos compuestos al máximo porque a los 93 DDS alcanzó el máximo peso (11.28 g) y las hojas tenían solo 15% de la clorofila inicial. En la var. Tollocan al contar con mayor área foliar la velocidad de pérdida de clorofila fue menor, a los 93 DDS alcanzó el peso máximo (16.71 g) y las hojas contaban con 20% de la clorofila inicial.

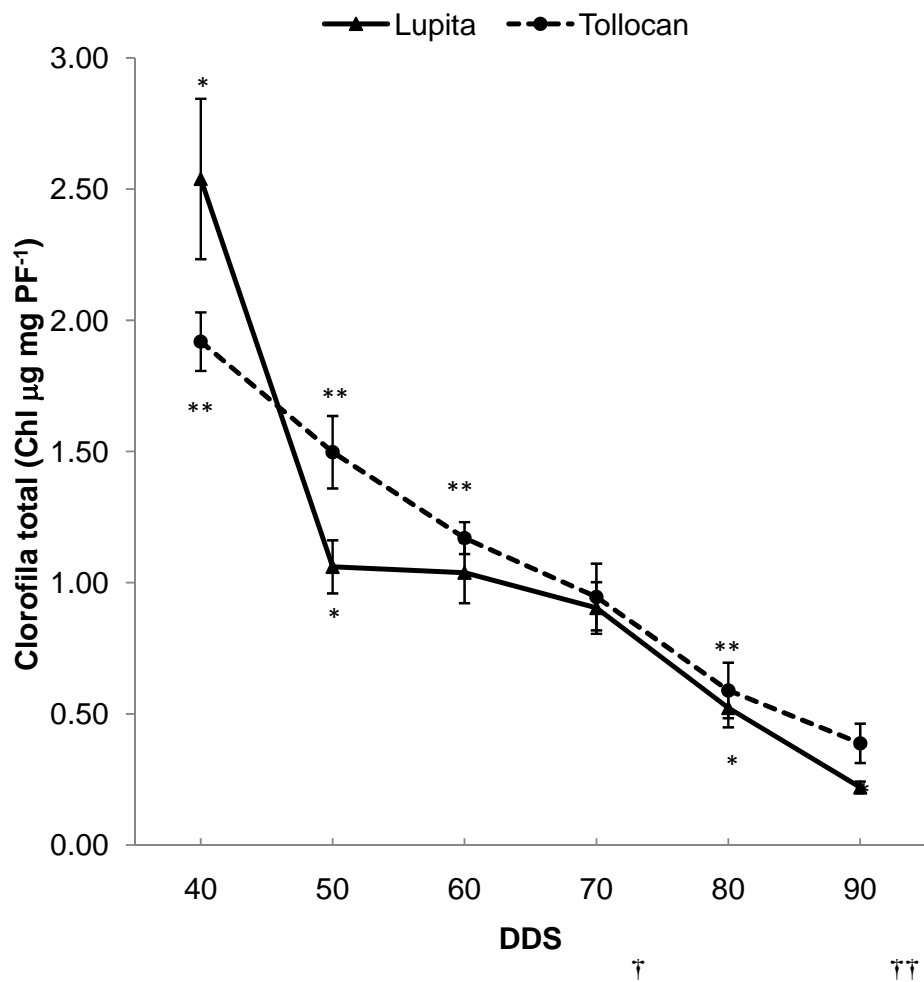


Figura 15. Clorofila total promedio de toda la planta durante el ciclo biológico de las var. Lupita y Tollocan. (†, ††) indica la cosecha comercial de la var. Lupita y var. Tollocan. Los datos son promedio  $\pm$  E.S. (n=5). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días de muestreo para cada variedad ( $p \leq 0.05$ ).

\* Diferencias significativas en la var. Lupita

\*\* Diferencias significativas en la var. Tollocan



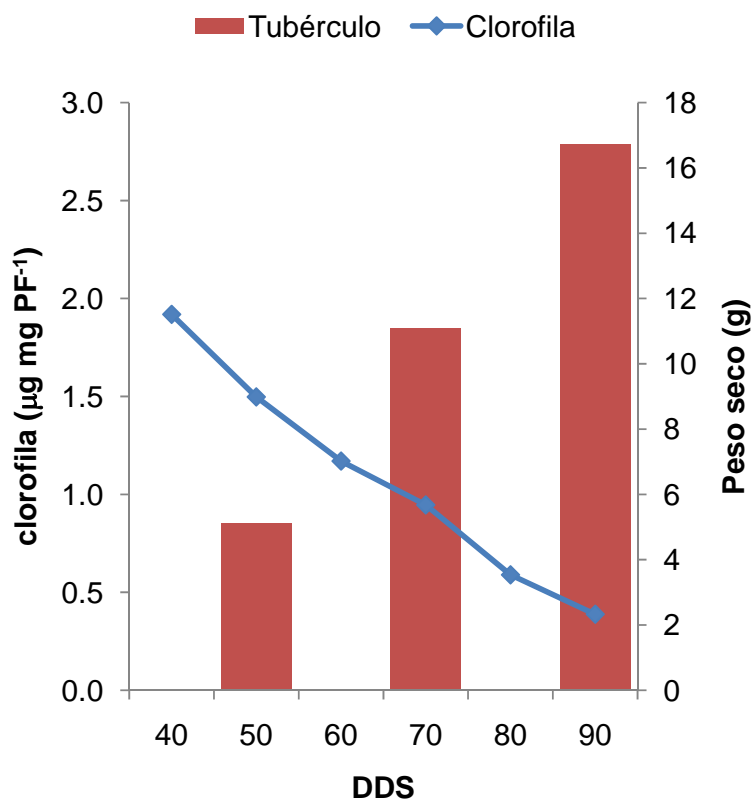
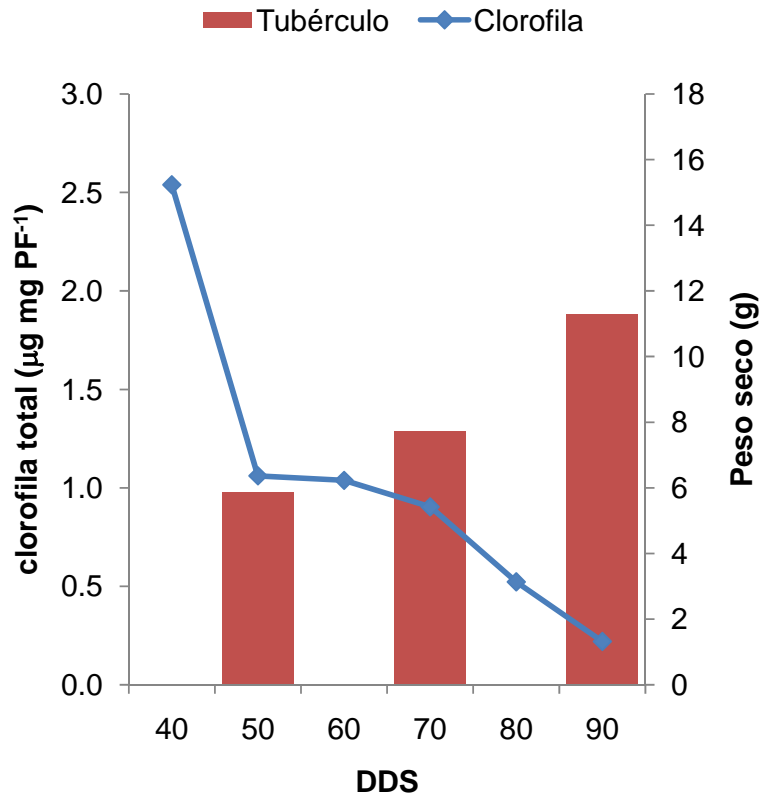


Figura 16. Relación de clorofila total y peso seco del tubérculo. A) var. Lupita B) var. Tollocan.

## 6.6 Proteínas foliares

**6.6.1 Cuantificación de proteínas solubles totales.** El Cuadro 4 muestra el contenido total de clorofila ( $\mu\text{g chl} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ ) y el promedio de la concentración de proteína soluble total ( $\mu\text{g chl} \cdot \text{mg PF}^{-1}$ ) de las variedades en diferente fecha de muestreo. La concentración de proteína durante la senescencia no mostró diferencias significativas en el tiempo y entre variedades. La concentración de proteína soluble en la var. Lupita se mantuvo sin variación. Estos resultados muestran que la proteína cuantificada no forma parte de las proteínas cloroplásticas porque el número de plastidios cambió en el tiempo y la población disminuyó drásticamente a los 93 DDS (Figura 17) y por lo tanto las proteínas contenidas en las hojas senescentes probablemente son proteínas de degradación. Durante la senescencia se activan genes llamados SAGs que se encargan de la síntesis de nuevas proteínas que regulan la degradación celular y translocación de productos hacia los sitios de demanda (Buchanan and Walleston *et al.*, 1997), en este caso hacia el tubérculo en crecimiento

**6.6.2 Subunidad grande de la Rubisco (LSU).** La Rubisco es una enzima que cataliza la primera reacción para la fijación del  $\text{CO}_2$  en las plantas, debido a esto se le considera como la proteína más importante en el metabolismo primario del reino vegetal. Se compone por ocho subunidades pequeñas (SSU) con un peso aproximado de 14 a 15 kDa; ocho subunidades grandes (LSU) de un peso promedio entre 52 y 55 kDa. La molécula completa tiene un peso aproximado de 480 kDa (Mauseth, 1993). El análisis del gel de poliácridamida, de las dos variedades estudiadas, mostró una intensa banda, de aproximadamente 52 KDa correspondiente a la subunidad grande (LSU). La var. Lupita presentó niveles altos de LSU en la etapa inicial, los cuales tendieron a disminuir progresivamente hasta los 93 y 99 DDS (Figura 18). Estos resultados indican

que la pérdida de la capacidad bioquímica para reducir CO<sub>2</sub> no se redujo abruptamente, como sucedió para el caso de clorofilas en la var. Lupita a los 50 DDS. Debe recordarse que la LSU es una proteína del estroma del cloroplasto, mientras que la clorofila se encuentra adherida al complejo colector de luz LHC (Mauseth, 2003; Salisbury y Ross, 1994). El mantenimiento de la LSU en altas concentraciones a los 50 DDS en la var. Lupita puede indicar que la planta necesita fijar más CO<sub>2</sub> en corto tiempo, comparado con la var. Tollocan que es de ciclo biológico más largo.

En la var. Tollocan la abundancia inicial (39 DDS) de LSU es menor que en la var. Lupita. Esta proteína en Tollocan se degrada más rápidamente (Figura 19). A los 93 DDS la banda es muy tenue y a los 99 apenas se detecta. Los bajos niveles de LSU encontrados en Tollocan pudieran estar asociados a una mayor abundancia de follaje y al ciclo biológico más largo, lo que permitiría a la planta compensar los requerimientos de fotosíntesis. Cabe señalar que en los geles también se observaron otras bandas de proteína con mayor peso molecular (132 y 103 kDa) que la LSU, pero con el tiempo desaparecieron.

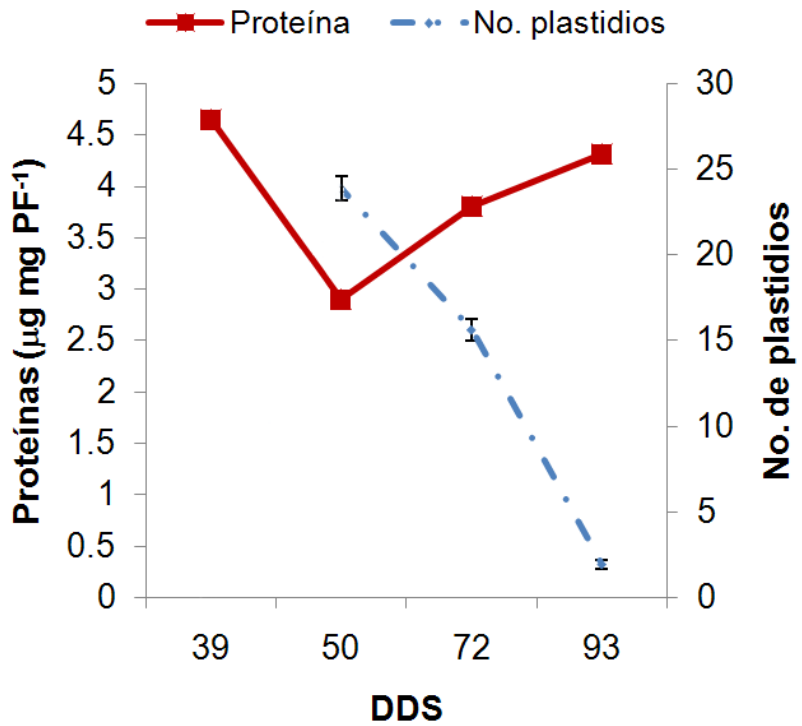
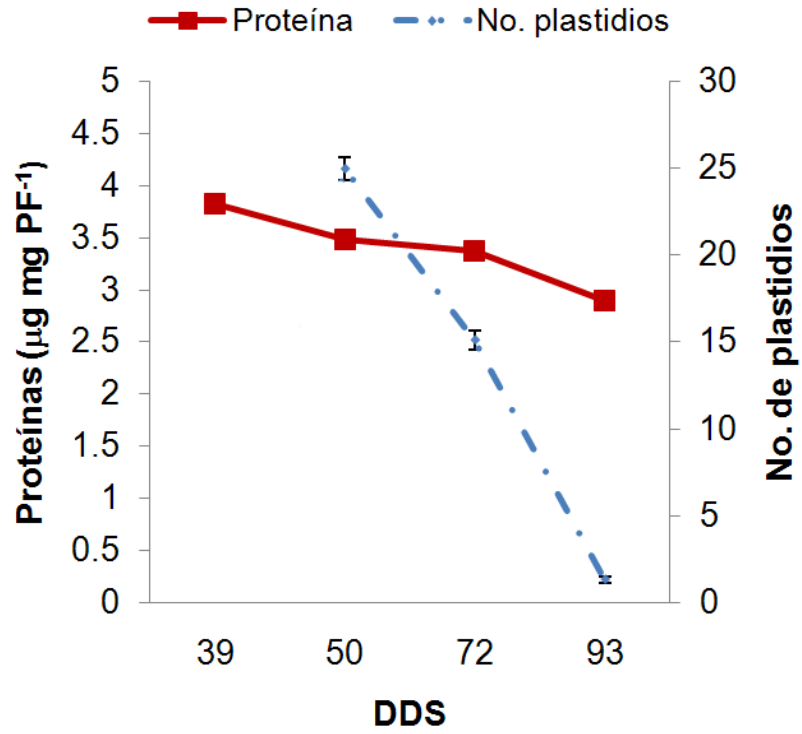


Figura 17. Relación de proteínas totales y número de plastidios, en este caso no se tuvo un conteo de plastidios a los 39 DDS. A) var. Lupita, B) var. Tollocan.

Cuadro 4. Contenido de clorofila y proteínas solubles totales de hojas de la var. Lupita y la var. Tollocan durante el llenado del tubérculo.

| DDS | Lupita                           |                                       | Tollocan                         |                              |
|-----|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
|     | Clorofila                        | Proteína                              | Clorofila                        | Proteína                     |
|     | ( $\mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{g proteína mg PF}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{g mg PF}^{-1}$ ) |
| 39  | 2.54                             | $3.82 \pm 0.23$                       | 1.92                             | $4.65 \pm 0.34$              |
| 50  | 1.06                             | $3.48 \pm 0.64$                       | 1.50                             | $2.90 \pm 0.56$              |
| 72  | 0.90                             | $3.37 \pm 0.28$                       | 0.95                             | $3.81 \pm 0.33$              |
| 93  | 0.22                             | $2.89 \pm 0.36$                       | 0.39                             | $4.31 \pm 0.65$              |

$\mu\text{g}$  = microgramos; chl = clorofila; PF = Peso fresco;  $\pm$  = error estándar.

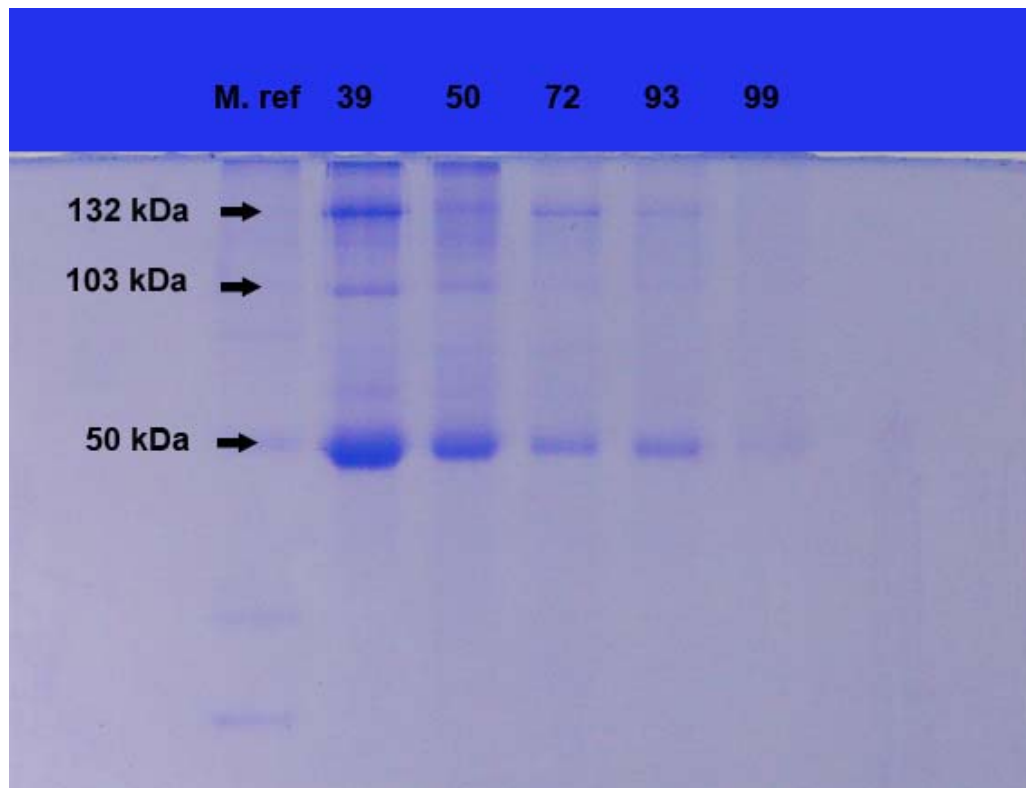


Figura 18. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) del foliolo terminal de la cuarta o quinta hoja de la var. Lupita. Abundancia de la LSU de Rubisco a los 39, 50, 72 y 93 DDS. Cada carril se cargó con 40  $\mu$ g de proteína. M. ref = marcador de referencia. Las flechas indican las proteínas (132 y 103 kDa) que disminuyen con la senescencia.

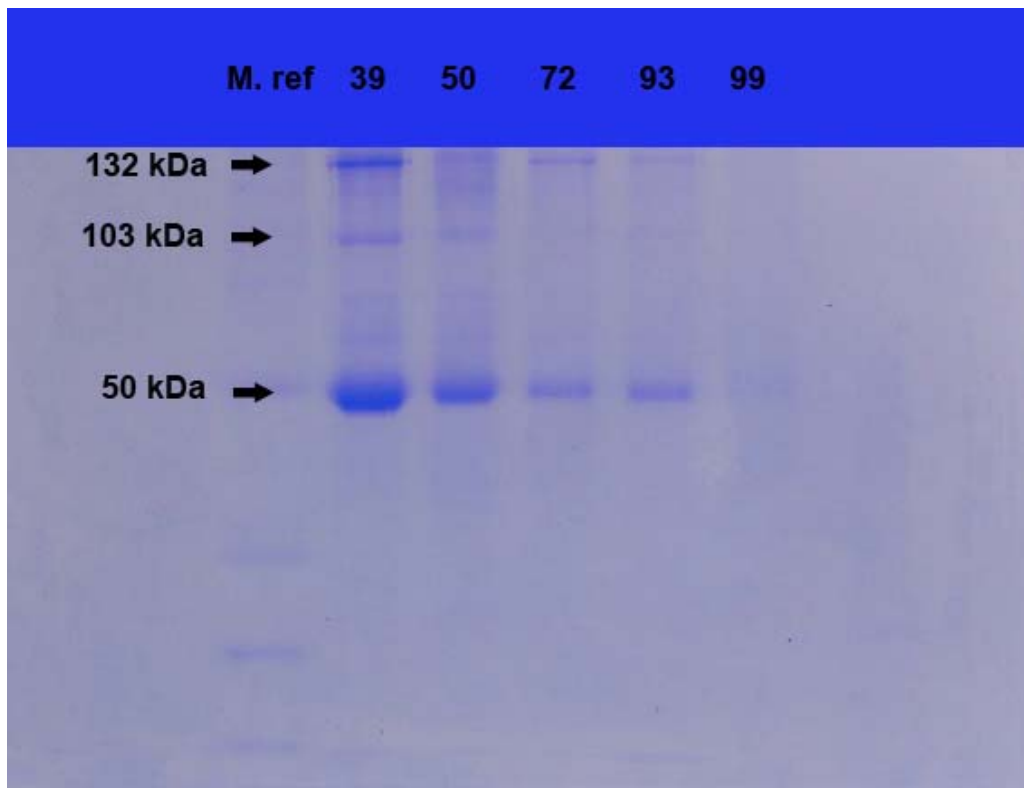


Figura 19. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) del foliolo terminal de la cuarta o quinta hoja de la var. Tollocan. Abundancia de la LSU de Rubisco a los 39, 50, 72 y 93 DDS Cada carril se cargó con 40  $\mu$ g de proteína. M. ref = marcador de referencia. Las flechas indican las proteínas (132 y 103 kDa) que disminuyen con la senescencia.

## **Discusión. Análisis de materia seca, IC e IAF**

El carbón asimilado (no perdido durante la respiración) incrementa la cantidad de materia seca de una planta y se utiliza para crecer o para acumular compuestos de reserva (Larcher, 2001), el cual se transloca de las hojas maduras hacia las partes en crecimiento como son los meristemos apicales, meristemos laterales o hacia las zonas de almacenamiento; sin embargo, el patrón puede alterarse si las hojas son removidas o sombreadas. En el caso de la papa, cuando la planta sufrió un daño mecánico en el tallo, las yemas laterales comenzaron a tuberizar y las hojas senescieron rápidamente (observaciones en invernadero). Por ejemplo, en la formación del fruto en la calabaza (*Cucurbita pepo* L.) las hojas envejecen más rápido porque los frutos se vuelven órganos demanda y compiten por los fotoasimilados de las hojas (Sedano *et al*, 2005). La acumulación de materia seca tanto de la parte aérea como del tubérculo en las dos variedades estudiadas, fue progresiva desde los 50 hasta 93 DDS. La mayor acumulación de materia seca fue en la parte aérea principalmente en la lámina; estos resultados concuerdan con trabajos realizados en papa, var. Alpha y var. Milagros mencionados por Aguilar *et al* (2006); en este trabajo las dos variedades de papa fueron sembradas en campo, la acumulación de materia seca por planta en promedio fue de 203 y 111 g, estas diferencias se deben al genotipo y la condición de siembra, pero la tendencia en la contribución de la hoja al peso seco aéreo fue similar. En la calabacita (*Cucurbita pepo* L.) se observó que la contribución a la acumulación de materia seca fue del 59.4% de las hojas, 34.1% de fruto inmaduro y 6.5% de tallos (Sedano *et al.*, 2005); en cambio en las plantas de *S. tuberosum* de la var. Lupita a los 72 DDS (considerando que es la fecha de cosecha comercial) mostró un valor de 11.98% en hoja, 6.42% en tallo aéreo y 81.58% en tubérculo. En la var. Tollocan presentó 11.5% en hoja, 7.0% en tallo aéreo y 81.50% en tubérculo a la cosecha comercial 93 DDS. En



el caso de la var. Lupita se observa que la planta invierte ligeramente más en follaje, pero comparativamente el IAF en Tollocan es mayor que Lupita.

Con el inicio de la tuberización, la parte aérea y los tubérculos compiten por los asimilados; esto se evidencia por el índice de cosecha (IC), que se define como la cantidad de materia seca acumulada en la semilla (Vega *et al.*, 2001) u órgano de interés como la papa (Aguilar *et al.*, 2006). El IC calculado para la var. Lupita fue de 0.69 a los 50 DDS, en contraste el IC calculado para la var. Tollocan fue 0.52 en la misma fecha. En Lupita se observa una mayor competencia por los asimilados, esto está relacionado con la tuberización temprana de la variedad. En los resultados de peso seco del tubérculo y parte aérea (Cuadro 1 y 2), se observa una relación directa de las dos variables; es decir, el incremento del peso del tubérculo en función del peso de la parte aérea. Estos resultados concuerdan con los observados en el comportamiento en 10 genotipos de papa, crecidos en la costa y en la sierra de Perú; en sus resultados de peso seco de la parte subterránea y parte aérea se observa que el incremento de la parte subterránea y aérea es proporcional con el tiempo (Victorio *et al.*, 1986).

La acumulación de la materia seca se usa para caracterizar el crecimiento de cualquier cultivo y así comparar la eficiencia de las variedades; además de la importancia económica que esto representa por la acumulación de biomasa en los órganos de interés. En el presente trabajo la TCT de Tollocan ( $1.54 \text{ g m}^2 \text{ día}^{-1}$ ), fue casi el doble que la TCT más alta de la var. Lupita (Cuadro 1 y 2). La producción de la materia depende del área foliar, su duración y la eficiencia, se menciona que existe una relación positiva entre el dosel aparentemente fotosintético (DAF) y el volumen de la cosecha en frijol (Jeuffroy and Ney, 1997), comúnmente los fotoasimilados se translocan de una hoja totalmente desarrollada hacia las zonas cercanas en crecimiento, pero se puede modificar la ruta de translocación si se eliminan estas zonas o si la

demanda aumenta en otro punto de la planta. Se sabe que si el dosel fotosintético está influenciado por la demanda entonces se interpreta que éste se relacionará con la cosecha.

Los análisis del crecimiento se utilizan para estudiar las condiciones que influyen en el crecimiento del cultivo y para conocer el peso neto de los componentes durante el ciclo biológico (Tekaling y Hammes, 2005). Se menciona que la partición de los asimilados entre los diferentes órganos de la planta es poco conocida, por lo que estudiar la distribución de la materia seca, en la papa (*S. tuberosum*), es importante para evaluar la tasa de crecimiento y productividad (Jeffroy y Ney, 1997).

Los IC para ambas variedades fueron muy cercanos en el último muestreo (Lupita 0.85 y Tollocan 0.81), a pesar de que el IAF fue 3.47 en Lupita y 7.52 en Tollocan, característico para cada variedad; puede indicar que la variedad temprana sea más eficiente en la translocación de los fotoasimilados como lo muestra la razón del peso seco del tubérculo y de la parte aérea, 5.96 en Lupita y 4.41 en Tollocan. La var. Milagros (ciclo intermedio) crecida en campo presenta una área foliar similar a la var. Tollocan (ciclo intermedio) y peso seco del tubérculo de 47 g al momento de la cosecha (Aguilar *et al.*, 2006), en el presente trabajo el peso seco de Tollocan fue 16.7 g, que fue menor que la var. Milagros, esto pudiera deberse a que Tollocan creció en condiciones de invernadero y con espacio reducido en la maseta (15 cm de diámetro). Un IAF mayor a 2 es necesario para inducir la tuberización en papa, cuando este valor es menor, la tasa de crecimiento es pequeña y no hay tuberización (Sánchez-Bernal *et al.*, 2008). En el caso de las variedades estudiadas se obtuvieron IAF mayores de 2.0 (Lupita 3.47 y Tollocan 7.52) antes de los 50 DDS, en esta fecha ya presentaban la suficiente área foliar para comenzar a tuberizar.

Los IC en la var. Lupita fueron mayores, que los observados en la var. Tollocan a los 50 y 72 DDS; la var. Tollocan alcanzó el mayor IC (0.81) a los 93 DDS, mientras que en la var. Lupita (temprana) alcanzó un IC de 0.82 a los 72 DDS (Cuadro 4). Estos resultados concuerdan con el ciclo de biológico de cada variedad. En el caso de otras especies vegetales; por ejemplo, la calabacita (*Cucurbita pepo*) tiene un IC de 0.29 y el trigo (*Triticum aestivum*) de 0.60 (Sedano *et al.* 2005). Para el caso de la variedad de papa Alpha (de ciclo intermedio,) considerada de alto rendimiento en campo, bajo en condiciones de temporal, presentó un IC de 0.70 (Aguilar *et al.*, 2006). Los valores altos de IC, observados en el presente estudio pueden atribuirse a que las variedades crecieron en condiciones de invernadero lo que favoreció la expansión foliar y por lo tanto el IC. En las condiciones que se llevó a cabo este experimento se podría establecer que el llenado del tubérculo fue el esperado porque la acumulación de materia seca es más acentuada antes de los 72 DDS en la var. Lupita y después de los 72 DDS en la var. Tollocan, fechas en que alcanzan un IC >0.70 reportado por Aguilar *et al.* (2006).

### **Contenido de Almidón**

El almidón se sintetiza a partir de la sacarosa en el mesófilo de las hojas y de ahí se transloca por el floema hacia otras partes de la planta (Bánfalvi *et al.*, 1996). La concentración de almidón reportada en tubérculos de papa (var. Alpha) crecidos en temporal, fue de aproximadamente 60  $\mu\text{g mg PF}^{-1}$  (Romero, 2010). En contraste en el presente trabajo se tuvo un valor máximo de 7.3  $\mu\text{g mg PF}^{-1}$  a los 50 DDS (Lupita) y 8.2  $\mu\text{g mg PF}^{-1}$  a los 93 DDS (Tollocan). En el caso de la var. Lupita, la disminución en almidón se observó después de los 50 DDS, lo cual pudiera estar asociado a una degradación del almidón en días posteriores a su fecha de cosecha (72 DDS) (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006), al respecto Hertog *et al.*, 1997 mencionan que un

tubérculo no es estático por lo que hay un constante flujo de carbohidratos liberados por respiración. Cabe mencionar que el método utilizado fue colorimétrico y la reacción fue inestable por lo que se requiere un método más preciso como el usado por González *et al.* (2009), el cual consiste en una reacción enzimática y la cuantificación final fue de glucosa. Se menciona que durante la fase de crecimiento los tubérculos acumulan grandes cantidades de almidón, sin embargo algunos genes de degradación de esta molécula se expresan en los últimos estados de desarrollo del tubérculo (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

### **Senescencia foliar**

La madurez de la hoja se caracteriza por la expansión completa de la lámina y la detención del crecimiento. El primer síntoma de senescencia foliar es el amarillamiento de la lámina, como resultado de la pérdida de la clorofila, con respecto a las xatofilas y carotenoides (Smart 1994). En estado verde (40 DDS) la var. Lupita presentó 40 SPAD ( $2.54 \mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ) y la var. Tollocan 40.9 SPAD ( $1.92 \mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ). A los 70 DDS, las hojas mostraron los primeros síntomas de amarillamiento, las de Lupita 28 SPAD ( $0.90 \mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ) y Tollocan 29 SPAD ( $0.95 \mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ). En un estado más avanzado de senescencia (90 DDS), la clorofila disminuyó marcadamente en la var. Lupita 9.2 SPAD ( $0.22 \mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ), mientras que en la var. Tollocan mantuvo niveles más altos 14.6 SPAD ( $0.39 \mu\text{g chl mg PF}^{-1}$ ). Durante la senescencia de la hoja trifoliada de la papa el contenido de clorofilas (Chl a + Chl b) disminuyó significativamente con una tendencia casi lineal en Tollocan (Figura 13). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en cuatro genotipos de papa (Spunta, Sieglinde, Daytona y Ninfa) (Ierna, 2007), observándose valores entre 35 y 40 SPAD en el estadio verde. El amarillamiento de las hojas también indica una reducción en la

concentración de nitrógeno y clorofila asociadas con la translocación de los productos de degradación del cloroplasto, el cual es el principal reservorio de estas moléculas (Vos y van der Putten, 2001). El sombreado también reduce la concentración de nitrógeno en hojas de papa promoviendo el envejecimiento. Cuando las plantas de Lupita y Tollocan comenzaron a tuberizar, la senescencia se presentó en un gradiente acrópeto (de la base hacia la punta); es decir, las hojas basales senescieron primero que las apicales. Se encontró que la variedad de ciclo corto (Lupita) presentó una concentración mayor de clorofila que la de ciclo intermedio (Tollocan), esto pudiera estar asociado a la necesidad de la variedad de ciclo corto de sintetizar rápidamente los fotoasimilados necesarios para el llenado del tubérculo. Los pigmentos fotosintéticos, contenidos en los complejos cosechadores de luz LHC, son los encargados de canalizar la energía a los centros de captación de energía lumínica (Larcher, 2001), entonces entre mayor sea la cantidad de clorofila, la hoja tendrá una mayor capacidad de captación de luz. La Rubisco es la enzima que cataliza la combinación de un átomo de carbono del CO<sub>2</sub> con un azúcar de cinco carbonos (Ribulosa fosfato) para formar un azúcar de seis átomos de carbono (Kollogg y Juliano, 1997), como se mencionó anteriormente la Rubisco está formada por subunidades grandes (LSU), los niveles altos de la LSU en la var. Lupita, podrían explicar una mayor capacidad bioquímica para fijar CO<sub>2</sub> en un periodo menor que Tollocan (Figura 15). Durante la senescencia de Lupita se observó una pérdida temprana (50 DDS) de las clorofilas; esto concuerda con el tipo de ciclo corto de la variedad. Algunos investigadores señalan que durante la senescencia foliar se incrementa la razón de clorofila *a/b* (Pruzinská *et al.*, 2005). Se propone que la chl *b* es convertida a chl *a*, la ruta de degradación de la molécula de clorofila *a* es bien conocida en varias especies vegetales, se sabe que los productos primarios de degradación, fluorescentes y no fluorescentes son transportados a la

vacuola (Hörtensteiner, 2006); sin embargo, los resultados de González *et al.* (2009), en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), indican que esta relación es inversa; es decir la clorofila *a* es más afectada que la clorofila *b* durante la senescencia de trigo.

La tuberización se asocia con cambios visuales en la planta, las hojas llegan a ser delgadas y palidecen, se observa un cambio en el ángulo de inserción de la hoja y se reprime el crecimiento de flores y ramas laterales; se acelera la senescencia coincidiendo con el rápido crecimiento de los tubérculos, estos cambios morfológicos junto con las condiciones que inducen la tuberización están influenciados por estímulos hormonales y ambientales (Rodríguez-Falcón, 2006). Se ha observado que el crecimiento vegetativo (follaje) inhibe la tuberización, porque la planta canaliza los fotosintatos al crecimiento de las estructuras vegetativas (Aguilar *et al.*, 2006).

## **SDS-PAGE**

La mayor parte (70%) del nitrógeno de las hojas de tipo C3 está localizado en el cloroplasto; la enzima Rubisco es la principal proteína contenida en este organelo, constituye 50% del total de la proteína del cloroplasto (Larcher, 2001). La Rubisco presenta dos subunidades: la grande (LSU) con un peso aproximado de 52 kDa y la pequeña (SSU) con un peso aproximado de 14 kDa, además de ser la primera de las 13 enzimas que regulan el ciclo de Calvin en el estroma del cloroplasto (Mauseth, 2003). La síntesis de la Rubisco ocurre durante el desarrollo de la hoja hasta la expansión; después comienza a degradarse hasta sus componentes básicos (amino ácidos), los cuales se translocan hacia otras partes y órganos demanda (Enyedi *et al.*, 1992). En el presente trabajo se muestreó la 4ª o 5ª hoja a partir del suelo hacia al ápice, con el fin de conocer cómo se comportaba la enzima durante el ciclo biológico de las plantas. Los resultados mostraron que los niveles de LSU disminuyeron con el tiempo. Esto es

consistente con los resultados encontrados en otras especies (trigo, frijol, arroz), la LSU esta asociada con el estado de senescencia foliar (González *et al.*, 2009; Feller *et al.*, 2008; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008; Buchanan-Wolleston *et al.* 1997, Kamachi *et al.* 1991), en estos trabajos la Rubisco mostró un patrón de degradación particular para cada variedad (Figura 16 y 17). En el caso de Lupita (temprana) la proteína fue más abundante en estado verde y los niveles de ésta se mantuvieron por más tiempo, a pesar de que la clorofila se degradó rápidamente a los 50 DDS. La permanencia de la Rubisco pudiera ser una estrategia de las variedades tempranas para mantener la fijación de CO<sub>2</sub> y compensar el período corto del llenado del tubérculo. En el caso de la Tollocan (intermedia), la cantidad relativa de la Rubisco en estado verde fue menor que Lupita pero la degradación de la enzima ocurrió paulatinamente, así como la clorofila total. La degradación de la enzima es debido a la proteólisis por parte de proteasas endógenas al cloroplasto, también se menciona que algunas moléculas como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum*, predisponen a la Rubisco para su degradación (Enyedi *et al.*, 1992).

Una posible explicación del por qué se presentó este patrón de degradación de la Rubisco podría explicarse considerando la posición de la hoja analizada, debido a su posición basal formaría parte de las primeras hojas en presentar senescencia como sucede en la solanácea *Nicotiana rustica*, la cual presenta una senescencia secuencial de la base hacia el ápice (Zavaleta *et al.*, 1999). Como las hojas basales son las primeras en senescer estas hojas serían buenos indicadores del inicio de senescencia y llenado del tubérculo.

La degradación de las proteínas del estroma puede darse en diferentes patrones de fragmentación, esto depende de las condiciones experimentales como el pH, concentración de solutos (durante la incubación); en algunos reportes se señala que la

Rubisco se puede fragmentar en 37 kDa y 16 kDa, aunque también se indica que se le asocia con un fragmento de la subunidad grande de la Rubisco (LSU) con un peso de 50 kDa, esta proteína se localizó con técnicas inmunológicas en hojas de trigo (Höstenteiner, 2002). Se detectaron proteínas con pesos moleculares de 27, 36, 39, 42, 46 y bandas de alrededor de 66 kDa en hojas de trigo senescentes bajo condiciones de obscuridad continua (Martínez *et al.*, 2007), estos autores mencionan que la proteína de 46 kDa se expresa más en estados avanzados de senescencia. Se han encontrado proteínas asociadas a la senescencia como el inhibidor Bax (Bax inhibitor) que codifican enzimas de ~27 kDa. En hojas de trigo asperjadas con la citocinina (BAP) para retrasar la senescencia, se encontraron bandas de proteína de 55 kDa identificadas como parte de la Rubisco (LSU). En la var. Lupita y Tollocan se observaron proteínas mayores a los 113 kDa (peso de referencia del marcador utilizado), cuyos pesos aproximados fueron de ~132 kDa; también se observó una proteína de ~103 kDa, las cuales disminuyeron con el progreso de la senescencia. Análisis de electroforesis en dos dimensiones se encontró que en hojas de maíz (*Zea mays*) la subunidad  $\beta$  de la ATPasa presentó un tamaño de 108 kDa, este tamaño está muy cercano al encontrado en las hojas de papa (103 kDa), mientras que en pepino (*Cucumis sativa*) se encontró la subunidad grande de la rubisco tuvo un tamaño de 52 kDa, el cual está cercano al valor de la LSU de la rubisco en la presente investigación (Porubleva *et al.*, 2001).

### **Proteínas solubles**

En estado verde (39 DDS) la var. Lupita presentó  $2.54 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  de clorofila y  $3.82 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  de proteína (valores máximos en la variedad); a los 50 DDS la clorofila disminuyó a  $1.06 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  y la proteína se mantuvo en  $3.48 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ , esto señala que los pigmentos son los primeros en degradarse; a los 72 DDS la clorofila disminuyó



a  $0.90 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  y la proteína disminuyó a  $3.37 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  y a los 93 DDS la clorofila se redujo a  $0.22 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  y la proteína  $2.89 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ , estos resultados indican que la clorofila se degrada más rápidamente que la proteína contenida en la hoja; la presencia de las proteínas en las hojas senescentes pueden estar asociadas a las enzimas codificadas por los genes asociados a la senescencia (SAG) o diferentes tipos de proteasas (Martínez *et al.*, 2007).

En estado verde (39 DDS) la var. Tollocan presentó una menor concentración de clorofila ( $1.92 \mu\text{g mg PF}^{-1}$ ) que la var. Lupita ( $2.54 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PF}$ ), pero la concentración de proteína ( $4.65 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PF}$ ) fue mayor que la de Lupita ( $3.82 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PF}$ ). A los 72 DDS la var. Tollocan tuvo  $0.95 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  clorofila y  $3.81 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  proteína; se observó que la concentración de proteína disminuyó pero no significativamente (Cuadro. 4). A los 93 DDS la 4ª o 5ª hoja la clorofila disminuyó a  $0.39 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  y  $4.31 \mu\text{g mg PF}^{-1}$  de proteína. De estos datos puede concluirse que la disminución en los contenidos de clorofila no es paralela a los contenidos de proteína en las hojas muestreadas en ambas variedades. Estadísticamente no hay diferencias en el contenido de proteína en el tiempo ( $p > 0.05$ ). En contraste el gel SDS-PAGE, mostró una disminución en la concentración en el contenido de la proteína Rubisco, la proteína más abundante de la hoja. Esto puede estar indicando que la mayoría de las proteínas medidas en senescencia avanzada (93 DDS) fueron proteínas codificadas por los genes asociados a la senescencia SAGs (Smart *et al.*, 2004). Durante la senescencia se expresan varios genes, los cuales codifican enzimas que se localizan en las vacuolas y sólo están en contacto con los cloroplastos hasta que las membranas se desintegran o aquellas proteínas que movilizan nitrógeno, degradan lípidos, degradan pared celular, movilizan fósforo, o también que funcionan como reguladores de transcritores,

antioxidantes, defensores de la senescencia, por mencionar algunas (Buchanan-Wollstone *et al.*, 2003).

Los contenidos de proteína foliar varían entre genotipos, por ejemplo la hoja verde de trigo presentó una concentración de  $9 \mu\text{g mg TF}^{-1}$  a los 21 DDS (González *et al.*, 2009). Por su parte Martínez-Gutiérrez *et al.*, (2008) encontró valores más altos ( $12 \mu\text{g mg TF}^{-1}$ ). En la planta de *Arabidopsis* la concentración de proteína fue de  $15 \mu\text{g mg TF}^{-1}$  (Li y Wu, 2004). En los tres trabajos mencionados los niveles de proteína disminuyen con el tiempo pero en papa no se encontraron diferencias significativas. Durante la senescencia las proteínas degradadas se transportan como amino ácidos que generalmente es la glutamina (Quirino *et al.*, 2000). Se menciona que el fotosistema I (PS-I) contiene una mayor proporción de la Chl *a*, mientras que la clorofila *b* se encuentra en mayor abundancia en el PS-II (Mauseth, 2003).

## 7 . C O N C L U S I O N E S

La variedad Lupita presentó mayor contenido de clorofila en estado verde ( $2.54 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) y la degradación de los pigmentos fue más acentuada a los 50 DDS, por lo que la translocación de los fotoasimilados hacia el tubérculo comenzaría más temprano que en Tollocan.

El mayor IC fue de la var. Lupita (85%), sin embargo la mayor tasa de crecimiento lo presentó la var. Tollocan  $1.54 \text{ g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ .

La var. Lupita (ciclo corto) invierte menos en tallo y hojas que la var. Tollocan durante el crecimiento, pero las hojas de Lupita presentaron mayor contenido de clorofila y LSU de Rubisco dándole a las hojas un potencial de fotosíntesis en estados tempranos.

La LSU de la Rubisco fue más abundante en la var. Lupita que en la Tollocan, condición que daría mayor capacidad de fijación de  $\text{CO}_2$  por superficie foliar, hecho que estaría relacionado con un IAF bajo, pero eficiente en el llenado del tubérculo en etapas tempranas.

El contenido de almidón fue más alto en la var. Tollocan a los 93 DDS y en la var. Lupita lo fue a los 50 DDS.

En el caso de la papa las características que presentan sus hojas como alto IAF de la var. Tollocan o mayor concentración de clorofila y de la proteína Rubisco de la var. Lupita responden a las necesidades de la planta para cumplir con la formación de tubérculo en su respectivo ciclo biológico.

## 8 . L I T E R A T U R A   C I T A D A

- Aerts, K., and R. F. Chapin. 2000. The mineral nutrition of wild plants, revised: a reevaluation of processes and patterns. *Ecological Research* 30:1-67.
- Alexander, J. Enyedi, A. J., Eckardt, N. A. Pell. 1992. Activity of Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from potato cultivars with differential response to ozone stress. *New Phytologist* 122: 493-500.
- Bánfalvi, Z., A. Molnár, L. Lakatos, L. Szabó. 1996. Starch synthesis, and tuber storageproteins genes are differently expressed in *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*. *FEBS Letters* 383: 159-164.
- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89: 1113-1121.
- Bayer. 2008. Manual del tizón tardío (*Phytophthora infestans*). Bayer CropScience. México. P 42.
- Borrego, F., J. M. Fernández, A. López, V. M. Parga, M. Murillo, y A. Carvajal. 2000. Análisis de crecimiento en siete variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agronomía Mesoamericana* 11:145-149.
- Buchanan-Wollaston, V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathias, S. Navabpour, T. Page, D. Pink. 2003. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1: 3-22.
- Calderón, G., y J. Rzendowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. edición CONABIO e Instituto de Ecología. Pátzcuaro, Michoacán, pp. 1406.
- Chen, J., S. Zhan, L. Zhan, Z. Zhao, J. Xu. 2002. Fruit photosynthesis and Assimilate translocation and partitioning : Their characteristics and role in sugar accumulation in developing *Citrus unshiu* fruit. *Acta Botanica Sinica* 44: 158-163.

- Clark, D. G., C. Dervinis, J. E. Barrett, H. Klee, and M. Jones. 2004. Drought-induced leaf senescence and horticultural performance of transgenic P SAG12-petunias. *Journal of the American Society Horticultural Science* 129: 93-99.
- De la Casa, A., G. Ovando, L. Bressanini, A. Rodríguez, y J. Martínez. 2007. Uso de índice de área foliar y del porcentaje de cobertura del suelo para estimar la radiación interceptada de papa. *Agricultura técnica* 67: 78-85.
- Escalante, J., J. Kohashi. 1993. El rendimiento y crecimiento del frijol. Manual para la toma de datos. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, estado de México. P 84.
- FAO. 2008. Nueva luz sobre un tesoro enterrado. Roma. 148 p.
- Feller, U., I. Anders, and M. Tahiko. 2008. Rubuscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal Experimental of Botany* 59: 1615-1624.
- Feller, U., I. Anders, and K. Demirevska. 2008. Degradation of Ribisco and other proteins under abiotic stress. *Genetic Apply Plant Physiology* 34:5-18.
- Giletto, C. M., H. E. Echeverria, V. Sadras. 2003. Fertilización nitrogenada de cultivares de papa (*Solanum tuberosum*) en el sudeste Bonaerense. *Ciencia del Suelo* 21:44-51.
- González-Santos, R., A. Delgado-Alvarado, A. H. Zavaleta-Mancera, B. E. Herrera-Cabrera. 2009. La Citocinina BAP promueve la acumulación de hexosas e incrementa la actividad de fosfato enolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxinasa durante el retraso de la senescencia foliar de trigo. *Agrociencia* 43 (4): 379-391.
- Hertog, M. L. A. T. M., L. M. M. Tijksens, P. S. Hak. 1997. The effects of temperature and senescence on the accumulation of reducing sugars during storage of potato

(*Solanum tuberosum* L.) tubers: A mathematical model. *Postharvest Biology and Technology* 10: 67-79.

Hopkins, M., C. Taylor, Z. Liu, F. Ma, L. McNamara, T. Wang, and J. E. Thompson. 2007. Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytologist* 175: 201-214.

<http://research.cip.cgiar.org/potato/GR/table.php?grp=allPV&tmpl=potato&frmt=html>

Huaman, Z. 1986. Botánica Sistemática y Morfología de la Papa. Centro Internacional de la Papa. *Boletín de Información Técnica* 6. Lima, Perú. 23 p.

Ierna, A. 2007. Characterization of potatoes genotypes by chlorophyll fluorescence during plant aging in a mediterranean environment. *Photosynthetica* 45: 568-575.

INEGI. 2006. El sector alimentario en México. Serie de estadísticas sectoriales.

Jackson, S. D. 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* 119:1-8.

Jeuffroy, M., and B. Ney. 1997. Crop physiology and productivity. *Field Crops Research* 53: 3-16.

Kamachi, K., T. Yamada, T. Mae, and K. Ojima. 1991. A Role for Glutamine Synthetase in the Remobilization of Leaf Nitrogen during Natural Senescence in Rice Leaves. *Plant Physiology* 96: 411-417.

Kellogg, E., and N. Juliano. 1997. The structure and function of RuBisCO and their implications for systematic studies. *American Journal of Botany* 84: 413-418.

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

- Larcher, W. 2001. *Physiological Plant Ecology*. 4th edition. Springer-Verlag, Germany Pp. 34-56.
- Lichtenthaler, K. H., A. R. Wellburn. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Lin, J., and S. Wu. 2004. Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *The Plant Journal* 39: 612-628.
- Makino, A., Mae T., Ohira K. (1983) Purification and storage of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from rice leaves. *Plant Cell Physiol* 24: 1169-1173.
- Martínez, D. E., C. G. Bartoli, V. Grbic, and J. J. Guiamet. 2007. Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different actors. *Journal Experimental of Botany* 58: 1099-1107.
- Martínez-Gutiérrez, R., H. A. Zavaleta-Mancera, L. M. Ruíz-Posadas, A. Delgado-Alvarado, R. Vaca-Paulín. 2008. Intercambio de gases y relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo (*Triticum aestivum* L.) por la citocinina BAP. *Interciencia* 33: 140-140.
- Mauseth, J. D. 2003. *Biology an introduction to plant biology*. Jones and Bartlett. U.S.A. P 847.
- Mullins, E., D. Milbourne, C. Petti, B. M. Doyle-Prestwich, and C. Meade. 2006. Potato in the age of biotechnology. *Trend in Plant Science* 11: 254-260.
- Murashige, T., and F. Skoog. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Porubleva, L., K. Vander V., S. Kothari, D. J. Oliver, P. R. Chitnis. 2001. The proteome of maize leaves: Use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of protein with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22:1724-1738.

- Quirino, B. F., Y. Noh, E. Himelblau, and R. Amasino. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5:1360-1385.
- Rivera, A. 2008. Generación de variedades de papa en México. Memoria del Congreso Nacional de papa. Los Mochis, Sinaloa, México, noviembre 27, 28 y 29. Pp. 45-48.
- Rodríguez-Falcón, M., J. Bou, and S. Prat. 2006. Seasonal control of tuberization in potato: Conserved elements with the flowering response. *Annual Review Plant Biology* 57:151-180
- Romero, R. M. T. 2010. Respuestas oxidativas de plantas de *Solanum tuberosum* L. infectadas por fitoplasma. Tesis Doctorado, UNAM. P 171.
- Salas, R. J. E., J. Mogollón, M. E. Sanabria. 2003. Anatomía de estructuras vegetativas y origen de los estolones, microtubérculos y raíces adventicias en plantas in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Granola. *Revista de la Facultad Agronomía*. 20:131-143.
- Salisbury, F. B., C. W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editora Iberoamericana. México, D.F. P 237.
- Sánchez-Bernal, E. I., M. Ortega-Escobar, V. González-Hernández, M. Camacho-Escobar, y J. Kohashi-Shibata. 2008. Crecimiento de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha, inducido por diversas soluciones salinas. *Interciencia* 33:643-650.
- Sedano C, G., V. A. González, E. M. Engleman, C. Villanueva. 2005. Dinámica del crecimiento y eficiencia fisiológica de la planta de calabacita. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11:291-297.
- Scheeler, P. 1993. Biología Celular. Limusa. México, D.F. 229-235.



- Teixeira, J., S. Pereira, F. Cánovas, R. Salema (2005) Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) plants: cell- and organ specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *Journal Experimental of Botany* 56: 663-671.
- Tekaling, T., P. S. Hammes. 2005. Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth II. Growth analysis, tuber yield and quality. *Scientia Horticulturae* 105: 29-44.
- Timlin, D., S. M. Lutford, J. Baker, V. R. Reddy, D. Fleisher, and B. Quebedeaux. 2006. Whole plant photosynthesis, development, and carbon partitioning in potato as a function of temperature. 2006. *Agronomy Journal* 98:1195-1203.
- Vega, M. R., J. A. Escalante E., P. Sánchez G., C. Ramírez A., E. Cuenca A. 2001. Asignación de biomasa y rendimiento de girasol con relación al nitrógeno y densidad de población. *Terra* 19:75-81.
- Viola, R., A. G. Roberts, S. Haupt, S. Gazzani, R. D. Hancock, N. Marmioli, G. C. Machray, N. Marmioli, G. C. Machray, K. J. Oparka. 2001. Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *The Plant Cell* 13:385-398.
- Vos, J. 1997. The nitrogen response of potato (*Solanum tuberosum* L.) in the field: nitrogen uptake and yield, harvest index and nitrogen concentration. *Potato research* 40: 237-248.
- Vos, J., and P. E. L. Van der Putten. 2001. Effects of partial shading of the potato plant on photosynthesis of treated leaves, leaf area expansion and allocation of nitrogen and dry matter in component plant parts. *European Journal Agronomy* 14: 209-220.
- Wang, F., A. Sanz, M. L. Brenner, and A. Smith. 1993. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology* 101: 321-327.

## C A P Í T U L O   I I

**Cambios estructurales y degradación nuclear en dos variedades de *Solanum tuberosum* L. var. Lupita y Tollocan durante la senescencia foliar**

## 1. R E S U M E N

La senescencia es un proceso dependiente de energía debido a la síntesis de nuevas proteínas que se encargan de la degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La primera estructura que cambia en la senescencia foliar es el cloroplasto, seguido por todos los organelos celulares y al final el núcleo. Se cuentan con reportes sobre la senescencia foliar en *Arabidopsis*, *Triticum aestivum* L. (trigo), *Oryza sativa* L. (arroz), *Nicotiana rustica* L. (tabaco); también en los pétalos de algunas flores con importancia comercial como petunia (*Petunia*), perritos (*Anthirrium*), alstroemeria (*Alstromeria*) (Yamada *et al.*, 2006; van Doorn *et al.*, 2005; Wagstaff *et al.*, 2005; Wingler *et al.*, 2005; Lin y Wu, 2000; Xu y Hanson, 2000; Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999), pero se cuenta con poca información con respecto a los cambios ocurridos durante la senescencia foliar en los que la translocación de fotosintatos es esencial para el llenado del tubérculo, como en el caso de la papa (*Solanum tuberosum* L.). En esta especie existen variedades con diferente ciclo biológico. La papa es considerada como uno de los principales cultivos alimenticios a nivel mundial, es cultivada y consumida ampliamente en América y Europa (Jackson, 1999).

Durante el envejecimiento celular de la hoja, el cloroplasto es el primer organelo en mostrar signos de desmantelamiento, luego la mitocondria muestra signos de deterioro de membranas, así como las demás estructuras dentro de la célula. El núcleo es el último organelo celular en degradarse, primero el ADN se fracciona dentro de la envoltura nuclear, formándose pequeños cuerpos de cromatina condensados y finalmente la doble envoltura nuclear se rompe. El mantenimiento de la integridad nuclear es necesaria para dirigir la expresión de genes asociados a la senescencia (del inglés; senescence associated genes, SAGs). La degradación nuclear en el proceso de apoptosis se conoce bien en células animales, pero poco se sabe acerca de la

degradación nuclear de las células vegetales y específicamente de las células verdes del mesófilo.

La integridad del núcleo normalmente persiste hasta etapas finales de la senescencia. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar el proceso de senescencia foliar en dos variedades de papa con distinto ciclo biológico: Lupita (ciclo corto) y Tollocan (ciclo intermedio), para entender el proceso de envejecimiento de la hoja y su relación con la formación del tubérculo. En este trabajo se relacionó la pérdida de pigmentos fotosintéticos, población de plastidios con la degradación de ADN y proteínas, contribuyendo al conocimiento de la PCD en *Solanum tuberosum*. La información obtenida tiene valor práctico como un indicador más de la tuberización.

Se realizaron muestreos del foliolo terminal para el análisis del ADN (en geles de agarosa), estructura foliar y conteo de cloroplastos en las variedades de papa Lupita y Tollocan. Los resultados obtenidos muestran que la var. Tollocan tuvo mayor espesor en la hoja (256  $\mu\text{m}$ ) que Lupita (181  $\mu\text{m}$ ), otra diferencia importante fue el grosor del parénquima esponjoso con 97  $\mu\text{m}$  en Lupita y 187  $\mu\text{m}$  en Tollocan. Con respecto al número de cloroplastos no se encontraron diferencias significativas entre las variedades, pero si entre los estados de senescencia. Los resultados de la electroforesis no se mostraron fraccionamiento del ADN en ambas variedades al menos hasta los 93 DDS, de manera que a hasta esta fecha de muestreo las variedades contaban aun con una pequeña fracción de clorofila (0.26  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) en Lupita y (0.39  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) en Tollocan.

Se concluye que la diferencia fue por la concentración de clorofila, siendo la var. Lupita la que más acumula. La anatomía foliar fue similar en ambos casos, con excepción del grosor de la lámina debido a que Tollocan tuvo el mayor grosor (256  $\mu\text{m}$ ). Hasta el día 93 después de la siembra no se observó ADN fraccionado en ambas variedades.

## 2 . A N T E C E D E N T E S

### 2.1 Senescencia

**Muerte celular programada (PCD).** De sus siglas en inglés programmed cell death (PCD) es un proceso genéticamente controlado; la expresión de nuevos genes servirá, durante la PCD, para dirigir de manera eficaz la cascada de procesos proteolíticos dentro de la célula (Jordán, 2003). Este proceso está asociado a cambios morfológicos, bioquímicos y estructurales que conducen a la muerte de la célula. La senescencia es un tipo de PCD que está regulada por la edad, se puede activar al entrar en contacto con patógenos, condiciones ambientales adversas y condiciones internas de estrés (Rogers, 2006; Coupe *et al.*, 2004; van Doorn and Woltering, 2004; Mittler *et al.*, 1997). Se menciona que ésta es el resultado de la permeabilización de las membranas celulares y la posterior pérdida del turgor (Yamada *et al.*, 2006). La literatura menciona que existen varios tipos PCD; por ejemplo, el género *Monstera* se caracteriza porque sus láminas presentan hoyos, debido a que en las primeras etapas sufrieron PCD; cuando los vasos conductores del xilema mueren en el transcurso de su desarrollo, se pierde el contenido celular para que en estado maduro puedan conducir agua y los solutos necesarios para toda la planta (Gepstein, 2004; Smart, 1994). También en la formación del corcho, en la respuesta hipersensitiva RH, la respuesta a la incompatibilidad del polen, en la formación del aerénquima de las raíces de *Sagittaria lancifolia* (Gladish *et al.*, 2006; Mittler y Lam, 1995; Palavan-Unsal *et al.*, 2005). La PCD se distingue de la necrosis porque en ésta no se requiere de energía, es un daño severo, violento y catastrófico, esto es ocasionado por un medio físico o por la presencia de toxinas; en ella se pierde la regulación de los procesos y conduce a la lisis de las membranas y la liberación del contenido celular. La necrosis ocurre cuando las condiciones llegan a ser tan estresantes que la célula es incapaz de mantener su

estructura y viabilidad (Gladish *et al.*, 2006; Jordán, 2003). Cuando se ejecuta el programa de la célula es un proceso irreversible e inevitablemente conduce a la muerte.

**La senescencia foliar, un tipo de PCD.** Las hojas pasan por tres estados de desarrollo: en un principio experimentan una rápida expansión y crecimiento, caracterizada por una demanda elevada de carbono y nitrógeno; el segundo es cuando la hoja se expande completamente para llegar a su madurez, la última etapa es la senescencia que se inicia al percibir algunas señales internas y externas que disparan la expresión de genes asociados con el desensamblaje celular previo a la muerte (Langston *et al.*, 2005, Teixeira *et al.* 2005, Ryun *et al.*, 2001). El término senescencia proviene del latín “envejecer” (Keech *et al.*, 2007; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Según Smart (1994) el concepto de senescencia es diferente al de envejecimiento, este último se refiere a los cambios degenerativos observables del organismo o tejido, los cuales ocurren en el tiempo, sin hacer referencia a la muerte del mismo; en cambio el término senescencia sí incluye a la muerte. Esta última etapa de la vida de la hoja no debe entenderse como un proceso de catabolismo desordenado, sino como un fenómeno ordenado y complejo. Uno de los primeros síntomas de la senescencia foliar se manifiesta por el cambio del color verde a amarillo, naranja, rojo e incluso café, dependiendo de la especie vegetal (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). La senescencia de la hoja comienza en las células del mesófilo, después se sigue a otros tipos celulares (Pyung *et al.*, 2007). Durante esta etapa se han encontrado genes que codifican enzimas hidrolíticas que se encargan de fraccionar y movilizan los nutrientes acumulados por fotosíntesis. La degeneración de las células en el tejido es lento, debido a que la planta asegurará la translocación de las macromoléculas hacia sitios de demanda como hojas, frutos o yemas de crecimiento (Pyung *et al.*, 2007) o bien hacia los sitios de

almacenamiento como tubérculos, raíces tuberosas y cormos (Keech *et al.*, 2007; Langston *et al.*, 2005).

Se menciona que las flores son un buen modelo para estudiar la senescencia, porque su tiempo de vida es corto y los cambios morfológicos y fisiológicos son evidentes. Por ejemplo, la senescencia de los pétalos de *Petunia* está acompañada por la hidrólisis de macromoléculas, que favorecen el desarrollo del ovario y las semillas. Desde un punto de vista energético, la translocación es un proceso favorable para la planta porque puede disponer de las moléculas que de otra manera se desecharían con el marchitado de los pétalos (Langston *et al.*, 2005). No obstante, otro modelo que se ha usado para estudiar la senescencia foliar es la especie *Arabidopsis thaliana* L., la cual se caracteriza por presentar un ciclo de vida corto, las hojas basales senescen primero en forma progresiva y esta forma de senescencia es conocida (Pyung *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista evolutivo la senescencia foliar, es una condición seleccionada para que las plantas sobrevivan cuando las circunstancias son desfavorables (Pyung *et al.*, 2007). Desde el punto de vista agrícola la senescencia foliar prematura limita la producción de materia de seca del grano; y en el caso de que el órgano de interés sea la hoja, que son usadas como alimento humano o forraje, la senescencia demerita el valor nutritivo y comercial. En el caso de flores de corte la senescencia prematura de las flores u hojas afecta la vida florero y por lo tanto su valor comercial.

**Condiciones que inducen la senescencia foliar.** La senescencia foliar se induce o acelera por variables externas e internas. Como variables externas pueden incluirse el ataque de patógenos (bacterias, hongos, virus), temperaturas extremas, exposición a ozono, radiación excesiva (estrés fotooxidativo), estrés hídrico, deficiencia de nutrientes, obscuridad prolongada (Keech *et al.*, 2007; Bhattacharjee, 2005; Coupe *et*

*al.*, 2004; Xu and Huang, 2004). Como variables internas puede incluirse la edad del órgano o envejecimiento de la planta; los reguladores de crecimiento como el etileno, donde la producción máxima promueve la marchitez de los pétalos en algunas especies (Langston *et al.*, 2005); las citocininas cuya reducción dispara la senescencia foliar, en algunos casos la presencia de auxinas acelera el proceso y en otros lo retrasa; en la etapa de reproducción se acelera la senescencia debido a que los asimilados se canalizan a los órganos reproductivos. Durante el metabolismo se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como el superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales de peroxi ( $ROO^\cdot$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), sin embargo, en la senescencia las ROS juegan un papel crucial debido a que son unos de los causante de la peroxidación de los lípidos de las membranas (Bhattachaejee, 2005; Vranová *et al.*, 2002). La ROS inhiben la función de algunas enzimas, dañando proteínas y lípidos de la célula (Mora y López, 2006).

**Retraso de la senescencia y reverdecimiento.** Durante el periodo de senescencia, las células del tejido foliar reciben una serie de señales fisiológicas que las conducen a la muerte. Sin embargo, la degradación del cloroplasto puede ser detenida y aún revertida por las citocininas, como se ha visto en trabajos previos con las especies de *Nicotiana rustica*, *Brassica oleraceae*, *Triticum aestivum*, *Dactylis glomerata* (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008; Wilson-García *et al.*, 2008; van Doorn and Woltering, 2004; Coupel *et al.*, 2004; Zavaleta *et al.*, 1999). En la naturaleza este fenómeno se muestra en *Zantedechia aethiopica*; después de la polinización, la espata experimenta un reverdecimiento debido a la transformación de los amiloplastos a cloroplastos (van Doorn, 2005). Zavaleta-Mancera *et al.* (1999) realizaron un experimento en el cual se reverdecieron hojas senescentes de *Nicotiana rustica* L. aplicando la citocinina (BAP), sus resultados mostraron que los gerontoplastos (cloroplastos senescenetes) se



trasformaron en cloroplastos verdes funcionales, con una alta concentración de clorofila, sin embargo las hojas senescentes asperjadas con BAP sólo podían reverdecer cuando los gerontoplastos contenían algunas membranas internas intactas y el 18% de su clorofila inicial (Zavaleta *et al.*, 1999). Estos últimos datos indican la plasticidad genética que tienen algunas especies vegetales, en las que puede observarse la rediferenciación de pastidios. Se menciona que los tratamientos que revierten la senescencia, tienen que actuar antes del punto de no retorno. El reverdecimiento también se obtiene eliminando la punta de la rama y las hojas inmaduras, para modificar la fuente y demanda y favorecer el retraso de la senescencia en hojas inferiores (Smart, 1994).

## **2.2 Cambios bioquímicos**

Algunos estudios demuestran que el inicio de la senescencia está determinada por la expresión de asociados a la senescencia (SAG, por su siglas en inglés) (Buchanan-Wollstone *et al.*, 2003). El síntoma más evidente de la senescencia foliar es el cambio del color, debido a la degradación de la clorofila (Gepstein, 2004). La degradación de la molécula de clorofila comienza con el rompimiento de la estructura del anillo tetrapirrólico, mediado por la clorofilasa; el producto de la reacción es un compuesto llamado clorofilide. La clorofilasa actúa de preferencia en la clorofila *a* aunque puede actuar en la clorofila *b*. Después se remueve el Mg por la enzima Mg-dequelatasa cuyo producto es la feoforbide, esta es transformada a un compuesto llamado catabolito rojo de clorofila (RCC) el cual es convertido en un catabolito fluorescente de clorofila (FCC) por la feoforbide *a* oxigenasa (PAO) y la enzima catabolito clorofila rojo reductasa (RCCR), finalmente el FCC se excreta hacia la vacuola donde por procesos de tautomerización se transforma en un catabolito no

fluorescente de clorofila (NCC). La degradación de la clorofila hasta el NCC es necesaria para prevenir la acumulación de intermediarios fitotóxicos. Esto último es un aspecto importante de la senescencia porque si fuera diferente, los productos serían peligrosos para la célula (Hörtensteiner, 2006). Keech *et al.* (2007) mencionan que durante la senescencia, los genes asociados a la fotosíntesis disminuyen, mientras que los encargados de la respiración y el transporte de electrones se mantienen o incrementan. La degradación de las macromoléculas se debe a una sobre expresión de genes que codifican enzimas encargadas de degradar lípidos, proteínas, nucleótidos y polisacáridos (Gepstein, 2004); algunos autores los agrupan en genes asociados a la senescencia (SAG). Los SAG se agrupan en dos categorías, aquellos que se expresan durante toda la senescencia y los que aparecen en las primeras etapas del desarrollo y se incrementan durante la senescencia (Teixeira *et al.*, 2005; Smart, 1994). En esta etapa las enzimas antioxidantes disminuyen su actividad y junto con las condiciones ambientales adversas, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son tóxicas para la célula y responsables de la peroxidación de las membranas (Xu and Huang, 2004). La glutamina sintetasa es una enzima importante en la asimilación del nitrógeno inorgánico a formas orgánicas, ésta cataliza la reducción del amonio y glutamato a glutamina, la glutamina es la que provee de nitrógeno orgánico a la planta. Las investigaciones demuestran que la concentración total de la glutamina sintetasa disminuye durante la senescencia. En cambio, se ha observado que la glutamina sintetasa 1 (GS1) se incrementa durante la senescencia y se sugiere que sea un SAG II (enzimas que aparecen durante la senescencia) (Teixeira *et al.*, 2005).

### **2.3 Cambios fisiológicos durante la senescencia**

En esta etapa del desarrollo los procesos anabólicos cambian a catabólicos (Gepstein, 2004). Durante la senescencia la asimilación de carbono es sustituida por el movimiento de carbohidratos hacia otras partes en crecimiento (Wagstaff *et al.*, 2005). Para que esto ocurra se sintetizan proteínas que cambian los procesos fisiológicos. Para la degradación de macromoléculas y su movilización participan varias proteasas como la cisteína proteasa, serina proteasa y aspartil proteasa que participan en la movilización del nitrógeno vía amino ácido transportado por el floema, en el transporte de azúcares, péptidos, amino ácidos y de cationes (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Mientras ocurren los procesos de degradación de las membranas se habla de que las enzimas antioxidantes comienzan a declinar su actividad (Xu and Huang, 2004). Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) mencionan que los tejidos senescentes se mantienen protegidos contra una muerte prematura, por el ataque de patógenos organismo oportunista, por medio de la síntesis de proteínas alternativas oxidasas (AOX) para evitar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el papel de la AOX es limitar la formación de ROS por la reducción de la actividad de la cadena respiratoria y con ello se reducir el estrés oxidativo en la mitocondria

En las flores de *Petunia* se observa una mayor producción de etileno, el cual regula el proceso de la senescencia de las flores, al mismo tiempo se observan los síntomas de marchitamiento de los pétalos (Langston *et al.*, 2005). Se sabe que el ácido salicílico (ASA), es una molécula importante en la respuesta señal a patógenos, sin embargo promueve la expresión de genes de senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

## 2.4 Cambios subcelulares

El amarillamiento de la hoja es indicativo de la pérdida de clorofila y de la desintegración de los cloroplastos (Gepstein, 2004). Una característica de la senescencia son los cambios estructurales del cloroplasto: las membranas de los tilacoides (grana) se desacoplan y comienzan a desintegrarse y al tiempo se forman vesículas lipídicas con material degradado conocidas como plastoglobulos, al mismo tiempo la cantidad de la enzima Rubisco disminuye (Keech *et al.*, 2007; Pyung, *et al.*, 2007). Después ocurre el desmantelamiento de los organelos membranosos como la mitocondria, aparato de Golgi y finalmente el núcleo. La pérdida de la membrana plasmática conduce al colapso y a la muerte celular (Pyung, *et al.*, 2007). Algunos reportes indican que las proteínas del estroma, Rubisco y glutamina sintetasa, se degradan por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). La mitocondria y el núcleo son los últimos organelos en desaparecer de la célula, se piensa que la mitocondria se encarga de mantener la producción de ATP necesario para llevar el proceso en orden y ser fuente de esqueletos de carbono para el ciclo del ácido tricarboxílico que facilita la movilización del nitrógeno y otros nutrientes (Keech *et al.*, 2007). En trabajos anteriores realizaron experimentos para conocer el efecto que tenía la obscuridad en la forma de las mitocondrias; en obscuridad las mitocondrias son casi esféricas, comparadas con aquellas que tuvieron iluminación normal (Keech *et al.*, 2007). En los cloroplastos las membranas tilacoidales contienen las clorofilas y varias proteínas organizadas en complejos cosechadores de luz llamadas en conjunto LHCI y LHCII, el citocromo y la ATP sintetasa, que son degradados durante la senescencia foliar. Los fotosistemas I y II (PSI y PSII) son unidades que poseen varios cientos de moléculas de clorofila, alrededor de 50 catotenoides, un citocromo f, una plastocianina, dos citocromos b<sub>564</sub>, una molécula de ferredoxina y un dímero de clorofila P700; en cambio el fotosistema II

tiene cerca de 200 moléculas de clorofila a y b que absorben a los 680 nm, 50 carotenoides, un dímero de clorofila, una quinona, cuatro plastocianninas, seis átomos de manganeso y dos moléculas de citocromo b<sub>559</sub> (Scheeler, 1993).

## 2.5 Degradación nuclear

**Deterioro del ADN.** Las evidencias experimentales indican que la senescencia es un proceso bajo control genético (Hensel *et al.*, 1993). El objetivo principal del catabolismo de los ácidos nucleicos, en la senescencia foliar, es degradar el ADN y ARN a sus componentes elementales y transportarlos hacia los tejidos demanda. Durante la degradación de los ácidos nucleicos se involucran ARNasa, ADNasa y endonucleasas, cuya actividad enzimática se incrementa durante la senescencia (Langston *et al.*, 2005). El fraccionamiento del ADN nuclear se observa durante los últimos momentos de vida de la planta, esto se evidenció en el envejecimiento natural de los pétalos de petunia Yamada *et al.* (2006). Algunos autores señalan que la degradación del ADN ocurre en dos fases; 1) se forman fragmentos de ADN de ~50,000 pb, ésta coincide con la condensación de la cromatina. 2) esta etapa se caracteriza por presentar fragmentos de ~200 pb. Los ensayos de TUNEL mostraron que posterior a la polinización, los pétalos presentaron fraccionamiento en más del 90% del ADN de los núcleos, en los geles de agarosa se revelan fragmentos de 160 pb (Yamada *et al.*, 2006; Langston *et al.*, 2005). Otros autores como Pagoria y Maravolo (2005) mencionan que los fragmentos de ADN característicos de la senescencia son de 180 a 200 pb, estos autores confirmaron la presencia de fragmentos de ADN en el talo de *Marchantia polymorpha*, usando la técnica de TUNEL. Esta técnica se basa en teñir sólo los extremos 3-hidroxil del ADN; en este ensayo se incorpora un oligonucleótido marcado

con un fluorocromo y con esto se asegura una visión de la cantidad relativa de ADN fraccionado *in situ* (Khrisnamurty, *et al.*, 2000).

**Cambios estructurales en el núcleo.** El fraccionamiento del ADN puede evidenciarse mediante varias técnicas: 1) Geles de agarosa para conocer la integridad del ADN (Gladish *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2006; Xu y Hanson, 2000), 2) Citometría de flujo (Jordán, 2003; Watanabe *et al.*, 2002), 3) Ensayo de TUNEL el cual consiste en marcar secuencias de bases libres mediante un anticuerpo etiquetado con un marcador fluorescente (Pagoria y Maravolo, 2005; Danon *et al.*, 2000), 4) Microscopía electrónica de transmisión (Gladish, *et al.*, 2006). Existe algunos trabajos enfocados al estudio del envejecimiento nuclear en diferentes tejidos; por ejemplo en pétalos de Petunia, en el talo de una hepática, protoplastos de hoja de *Brassica napus*, senescencia inducida en pétalos de petunia (Pagoria y Maravolo, 2005; Wagstaff *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2002; Xu y Hanson, 2000).

Se menciona que en las células animales, el núcleo sufre una serie de cambios característicos de la apoptosis: encogimiento nuclear, fraccionamiento del ADN, formación de cuerpos apoptóticos y digestión por macrófagos. Surgió entonces el interés por conocer el proceso de degradación nuclear pero en plantas, buscando similitudes y diferencias con las células animales. Danon *et al.* (2000) al realizar una revisión del tema, mencionan que la morfología del núcleo, de cultivos celulares de zanahoria, durante la PCD presenta condensación y encogimiento del citoplasma y núcleo. Así mismo se plantean tres tipos de fragmentación del ADN: en núcleos normales, en núcleos de media luna y fragmentados es un fenómeno parecido a la apoptosis.

El autor propone que la célula de zanahoria se hace más vacuolada, la cromatina del núcleo se condensa ligeramente y transcurrido más tiempo, la condensación es más evidente Watanabe *et al.* (2002). El núcleo se hace esférico y con varios cuerpos de cromatina condensada distribuida de manera uniforme. En otra etapa adquiere una forma aplanada y lobulada; en esta etapa la cromatina comienza a condensarse, presenta formas irregulares y finalmente el núcleo se desintegra (Gladish *et al.*, 2006). En un estudio realizado con flores de tres especies (*Antirrhinum*, *Argyranthemum* y *Petunia*), se muestra que cada una presenta un patrón de desintegración del núcleo diferente; *Antirrhinum* se caracterizó por presentar cuerpos pequeños de cromatina fragmentada dentro de la envoltura nuclear. En otro patrón se mostró que el núcleo se reduce en masas cada vez más pequeñas esto se observó tanto en *Petunia* como en *Argyranthemum* (Yamada *et al.*, 2006).

Son pocas las especies vegetales en las que se ha revisado el proceso de fraccionamientos del ADN. En la papa (*Solanum tuberosum*) no se conoce el fenómeno de senescencia foliar y menos aun los procesos de fraccionamiento del ADN en el núcleo. En el presente estudio se revisan los cambios en la concentración de pigmentos, población de plastidios y niveles de proteínas durante la senescencia foliar de dos variedades de papa con distinto grado de precocidad.

### **3 . O B J E T I V O S**

#### **Objetivo general**

Estudiar la degradación del ADN y los cambios en la población de plastidios en las variedades Lupita y Tollocan, durante la senescencia foliar.

#### **Objetivo específico**

Estudiar la integridad del ADN y su fraccionamiento mediante geles de agarosa durante la senescencia foliar.

Conocer la estructura foliar de las var. Lupita y Tollocan y caracterizar los cambios en la población de plastidios durante la senescencia foliar.



#### **4 . H I P Ó T E S I S**

Durante la senescencia foliar los componentes celulares son degradados y el núcleo será el último componente en degradarse

La fragmentación del ADN se presentará en la última etapa de la senescencia foliar en ambas variedades.

El número de plastidios disminuirá durante la senescencia foliar en ambas variedades.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Material biológico**

Se trabajó con las variedades de papa Lupita y Tollocan ya descritas en la sección 5.1 del primer capítulo. Las plantas provenientes de tubérculos de 30 DDS, fueron proporcionadas por el Ing. Víctor Magallanes del Programa Nacional de Papa del INIFAP-Metepec, estado de México. Se utilizaron hojas en tres estados de senescencia caracterizadas por el contenido relativo de clorofila: V= estado verde >40 unidades SPAD; S1= senescencia inicial 23-26 unidades SPAD; S2= senescencia avanzada <5 unidades SPAD.

### **5.2 Estructura foliar**

Se muestreo el foliolo terminal de la hoja del 4° y 5° entrenudo de seis plantas por estadio de senescencia (V, S1, S2) de cada variedad. Se cortaron fragmentos de 1x2 mm con una navaja de doble filo y fijaron en FAA [50% etanol, 5% ácido acético glacial, 10% formalina (formaldehído 37%) y 35% agua destilada] por 48 h, posteriormente los tejidos se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de fijador y luego se deshidrataron en etanoles graduales (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100, 100%) por 2 h en cada cambio. Después los tejidos se transfirieron a una secuencia de LR-White y etanol 100% (1:3), LR White-etanol 100% (1:1) y LR White-etanol 100% (3:1), durante tres horas en cada cambio a 4 °C. Luego se transfirieron a resina 100% por durante 11 h a 4 °C. Los tejidos se colocaron en cápsulas de gelatina de 2 cm de largo, las cuales se polimerizaron en una estufa a 62 °C por 24 h. Posteriormente los bloques de resina con el tejido se recortaron y orientaron en plano transversal, los cuales se volvieron a incluir con LR White. Los portaobjetos se lavaron con agua destilada y luego con acetona 100% para eliminar la grasa de la superficie. Se

obtuvieron cortes semifinos (2  $\mu\text{m}$ ) con un ultramicrotomo (Reichert Om U2), usando cuchillas de vidrio. Los cortes se tomaron con un anillo de 1 mm de diámetro. Se obtuvieron 10 cortes de cada bloque y se extendieron en un baño de flotación (acetona 10%), posteriormente se colocaron en el portaobjetos y se adhirieron colocándolos sobre una parrilla (60 °C). Para teñir los cortes se preparó azur II 1% (colorante A) y azul de metileno 1% en una solución de borax 1% (colorante B). Los colorantes A y B se mezclaron en partes iguales (1:1). Se colocó una gota de la mezcla (sol. A y B) sobre los cortes y se dejó el portaobjetos sobre la parrilla (previamente calentada a 60 °C) por 10 s. Luego el exceso de colorante se eliminó con agua desionizada. Para la observación en microscopio se agregó una gota de aceite mineral sobre el corte y se colocó un cubreobjetos. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico compuesto (Fotomicroscopio III Carl, Zeiss, Alemania). Las imágenes se capturaron en una cámara digital para microscopía (PAXCAM 3). Las imágenes se manipularon con el programa Adobe Photoshop CS3.

### **5.3 Conteo de cloroplastos**

Se contabilizó el número de cloroplastos por célula del parénquima en empalizada, no se contaron los cloroplastos de las células del parénquima esponjoso debido a su gran tamaño y forma irregular, el corte semifino (2  $\mu\text{m}$ ) no representaba a la célula. Se utilizó un cuadro de números aleatorios para seleccionar la célula. El conteo se realizó en 60 células de seis cortes provenientes de seis plantas diferentes, con el objetivo de 40X y 100X.

#### 5.4 Integridad del ADN

**Extracción del ADN.** Los folíolos terminales de las hojas del 4° y 5° entrenado se lavaron agua destilada. Se pesaron 200 mg de tejido fresco y se maceró con 1 mL de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 mM, CTAB 2%, PVP 1%,  $\beta$ -ME 0.2%, pH 8.0). Se tomó una alícuota de 750  $\mu$ L y se llevó a 65 °C por 90 min en baño seco, agitándose cada 7 min, luego se agregaron 750  $\mu$ L de solución de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión. La mezcla se centrifugó a 8,000 g por 5 min a 20 °C, se tomaron 400  $\mu$ L de sobrenadante y se agregaron 133  $\mu$ L de acetato de amonio 7.5 M. La mezcla se incubó en hielo por 10 min, se centrifugó a 10,000 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante. A un volumen conocido de sobrenadante se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se agitó por inversión. Las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 10 h. Después se centrifugaron a 8,000 g por 20 min y el precipitado se lavó con etanol 70% (agitando por inversión) luego se centrifugó a 8,000 g por 10 min, y se lavó nuevamente. El tubo con ADN precipitado se dejó escurrir sobre papel secante hasta que se observó transparente. Una vez seco el ADN se resuspendió con agua ultrapura (MilliQ), se agitó vigorosamente y luego se tomó una alícuota de 2  $\mu$ L para ser leído en el espectrómetro nanodrop (Thermo Scientific\_Nanodrop Modelo 1000) para medir su pureza y concentración ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ).

**Electroforesis en agarosa.** Se preparó un gel de agarosa TBE 1.5%. Se cargaron los carriles con 1000 ng de ADN y 2  $\mu$ L con la solución acuosa de Halt (azul de bromofenol 0.25%, 0.25% de xileno cianol FF, 30% glicerol). El marcador utilizado fue de amplio rango (Ladder 100, Invitrogen) (100 a 1500 pb). El gel corrió a 75 V por 90 min en una cámara de electroforesis horizontal para agarosa. EL gel se reveló con una solución de bromuro de etidio ( $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 30 min en agitación constante, se

dejó escurrir y se colocó directamente sin ningún lavado y se observó en un transiluminador y se tomaron fotografías en un fotodocumentador (UNISAVE modelo GAS9200/1/2/3 versión 12).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Estructura foliar

La hoja presenta una anatomía típica de una dicotiledónea. Las epidermis adaxial y abaxiales son uniestratificadas. El parénquima en empalizada es de un solo estrato, presenta parénquima esponjoso que representa dos tercios de la hoja (Figuras 20 a 25). Las láminas de los folíolos de la hoja trifoliada de la var. Lupita tuvo un espesor promedio de  $181 \pm 30 \mu\text{m}$ , mientras que en la var. Tollocan de  $256 \pm 8 \mu\text{m}$  (Cuadro 5). El ancho del parénquima empalizada con  $83 \mu\text{m}$  en ambas variedades. Se encontraron diferencias en el ancho del parénquima esponjoso (var. Tollocan) esto podría indicar que esta variedad presenta una mayor zona para el intercambio gaseoso. La epidermis adaxial y abaxial de las dos variedades presentaron dos tamaños en las epidermis. La var. Tollocan presentó mayores diámetros de las células epidérmicas abaxiales comparado con la var. Lupita (Cuadro 5). Las células del parénquima esponjoso de la var. Tollocan fueron más grandes en promedio ( $43 \pm 3 \mu\text{m}$ ) que las de la var. Lupita ( $37 \pm 3$ ) (Cuadro 5).

### 6.2 Conteo de cloroplastos y núcleos

El conteo de cloroplastos no indicó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades. El número de plastidios por célula, disminuyeron drásticamente cuando la hoja sufrió pérdida del 60% de su clorofila. En las hojas de las dos variedades, en estado V (60 SPAD) y S1 (23-26 SPAD), se observaron núcleos intactos en las células del parénquima en empalizada, parénquima esponjoso y células epidérmicas. En las hojas de la var. Tollocan con senescencia avanzada S2 ( $< 5$  SPAD), las células presentaron el tonoplasto colapsado con la presencia de cuerpos intensamente teñidos ( $1-2 \mu\text{m}$ ) de forma irregular dispersos en la célula. En el caso de la var. Lupita las

células del mesófilo esponjoso presentaron de 1 a 2 partículas irregulares ( $1 \mu\text{m}$ ), se observan pocos núcleos en el corte transversal probablemente debido a su forma estrellada.

La Figura 26 muestra el conteo de cloroplastos en las células de parénquima empalizada. La presencia de los estos organelos disminuyó de manera gradual. En las hojas V de Lupita y Tollocan, se obtuvo un promedio de  $25 \pm 0.66$  y  $24 \pm 0.72$  cloroplastos por célula empalizada; en hoja S1 tuvieron valores promedio de  $15 \pm 0.54$  y  $16 \pm 0.65$ ; las hojas S2 con  $1 \pm 0.16$  y  $2 \pm 0.27$  cloroplastos para Tollocan y Lupita, respectivamente. La comparación de medias (Duncan) indicó no diferencias significativas en el número de cloroplastos entre las variedades, pero si denotó diferencias entre los diferentes estados de senescencia (Figura 26).

Cuadro 5. Algunos caracteres anatómicos de las hojas de las variedades Lupita y Tollocan.

| Carácter  | Lupita       | Tollocan     |
|---|--------------|--------------|
| Ancho de la lámina foliar ( $\mu\text{m}^*$ )   | 186 $\pm$ 19 | 227 $\pm$ 30 |
| Ancho del parénquima empalizada en corte transversal ( $\mu\text{m}$ )                  | 74 $\pm$ 10  | 73 $\pm$ 13  |
| Ancho del parénquima esponjoso en corte transversal ( $\mu\text{m}$ ).*                 | 94 $\pm$ 17  | 120 $\pm$ 26 |
| Diámetro mayor de las células epidérmicas adaxiales de mayor tamaño ( $\mu\text{m}$ ).  | 68 $\pm$ 19  | 60 $\pm$ 18  |
| Diámetro mayor de las células epidérmicas adaxiales de menor tamaño ( $\mu\text{m}$ ).  | 24 $\pm$ 6   | 26 $\pm$ 9   |
| Diámetro mayor de las células epidérmicas abaxiales de mayor tamaño ( $\mu\text{m}$ ).  | 44 $\pm$ 24  | 43 $\pm$ 12  |
| Diámetro mayor de las células epidérmicas abaxiales de menor tamaño ( $\mu\text{m}$ ).* | 17 $\pm$ 30  | 22 $\pm$ 05  |
| Diámetro mayor de las células de parénquima esponjoso ( $\mu\text{m}$ ).                | 37 $\pm$ 20  | 35 $\pm$ 09  |

\*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )



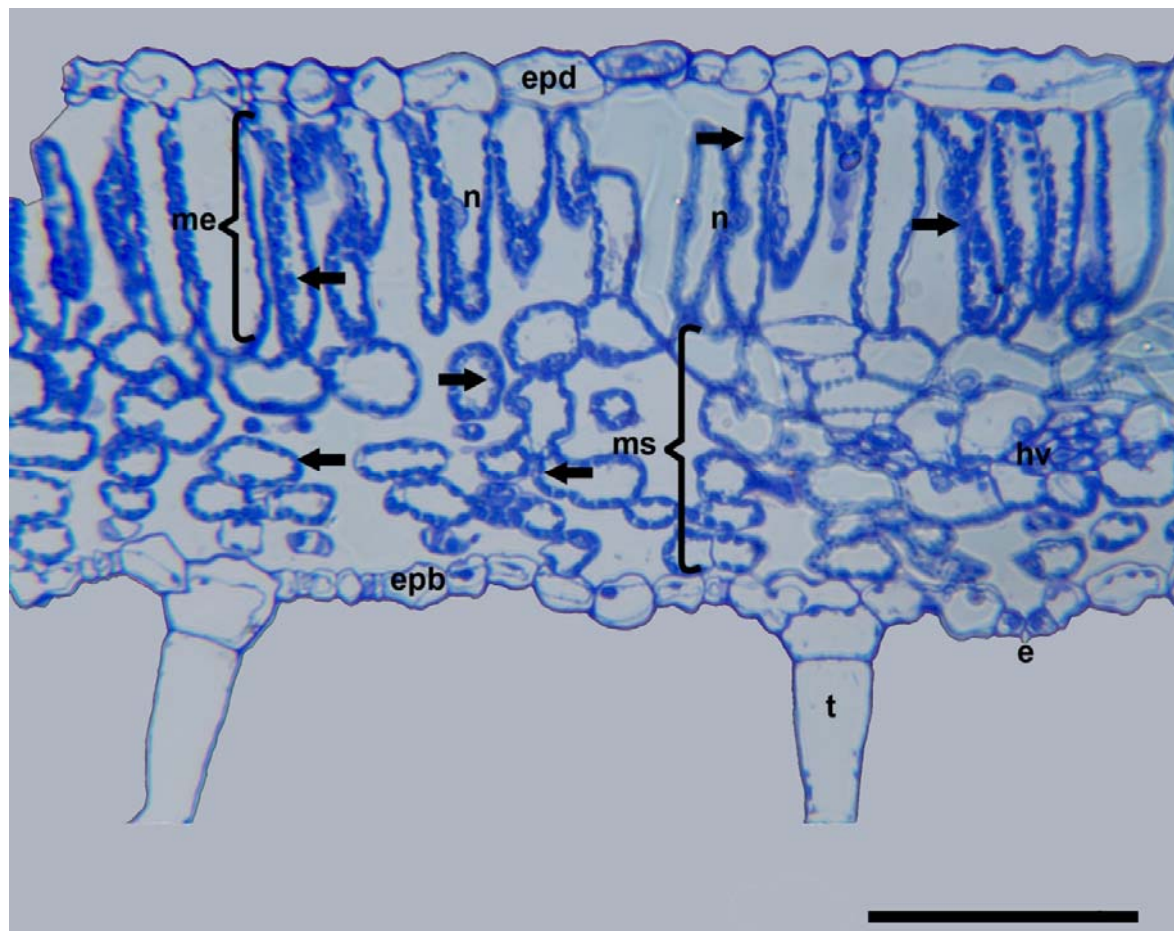


Figura 20. Corte semifino (2  $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa (*S. tuberosum*) var. Lupita en estado verde (51 SPAD), epb: epidermis abaxial; epd: epidermis adaxial; mp: mesofilo empalizada, ms: mesófilo esponjoso; t: tricoma, e: estoma; n: núcleo; hv: haz vascular; las flechas indican a los plastidios. La barra=100  $\mu\text{m}$ .

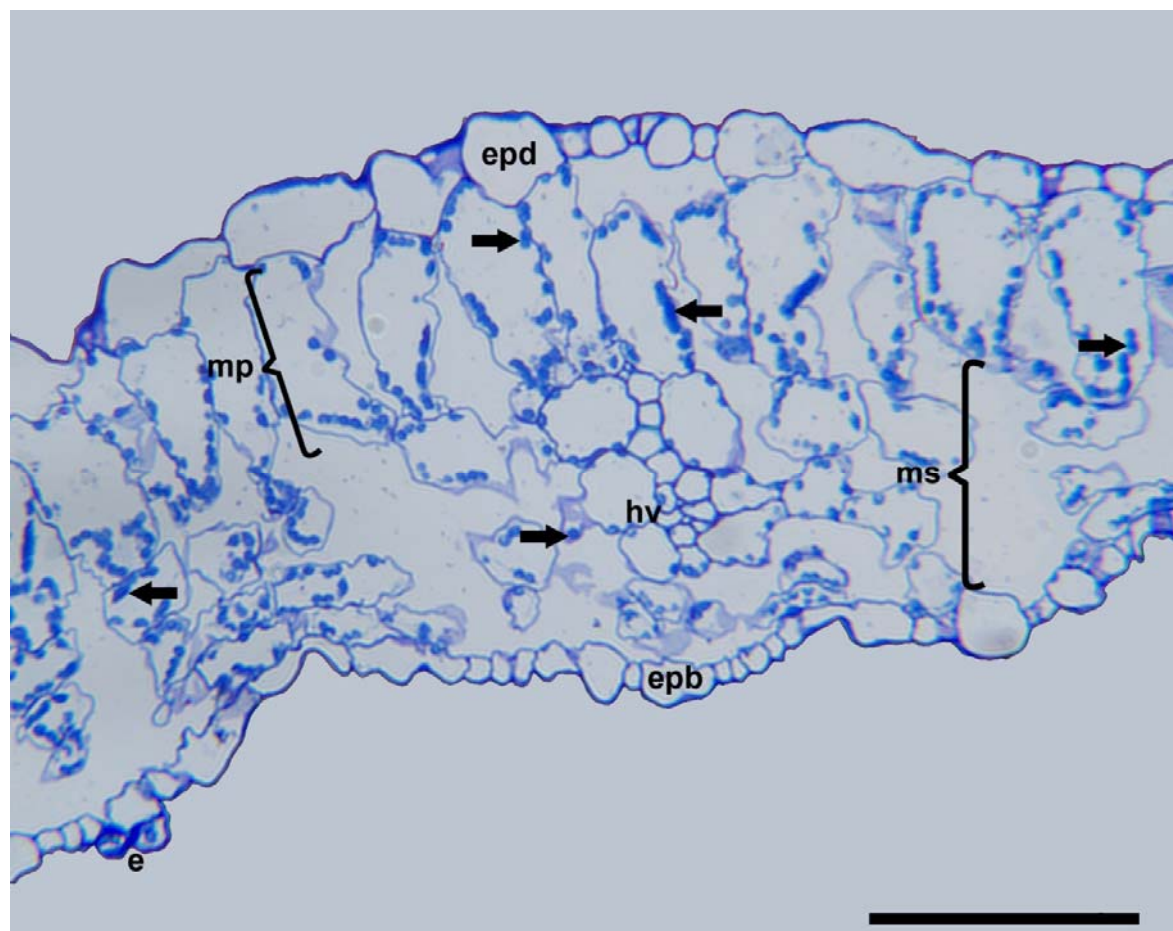


Figura 21. Corte semifino (2  $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa (*S. tuberosum*) var. Lupita en estado inicial de senescencia (S1: 23 SPAD), epb: epidermis abaxial; epd: epidermis adaxial; mp: mesofilo empalizada; ms: mesófilo esponjoso, t: tricoma; e: estoma; n: núcleo; hv: haz vascular; las flechas indican a los plastidios. La barra=100  $\mu\text{m}$ .

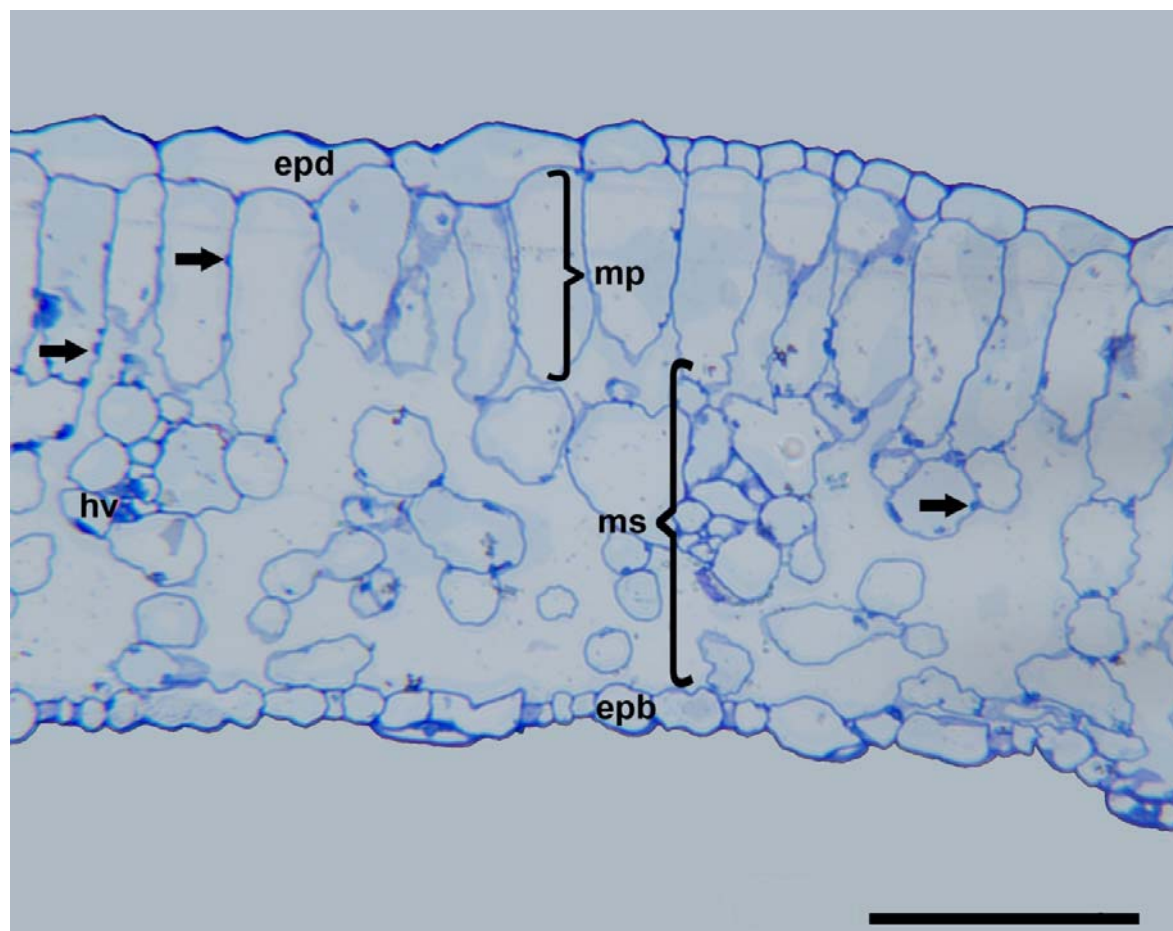


Figura 22. Corte semifino (2  $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa (*S. tuberosum*) var. Lupita en estado avanzado senescente (S2: 7 SPAD), epb: epidermis abaxial; epd: epidermis adaxial; mp: mesofilo empalizada; ms: mesófilo esponjoso; t: tricoma; e: estoma; n: núcleo; hv: haz vascular; las flechas indican a los plastidios. La barra=100  $\mu\text{m}$ .

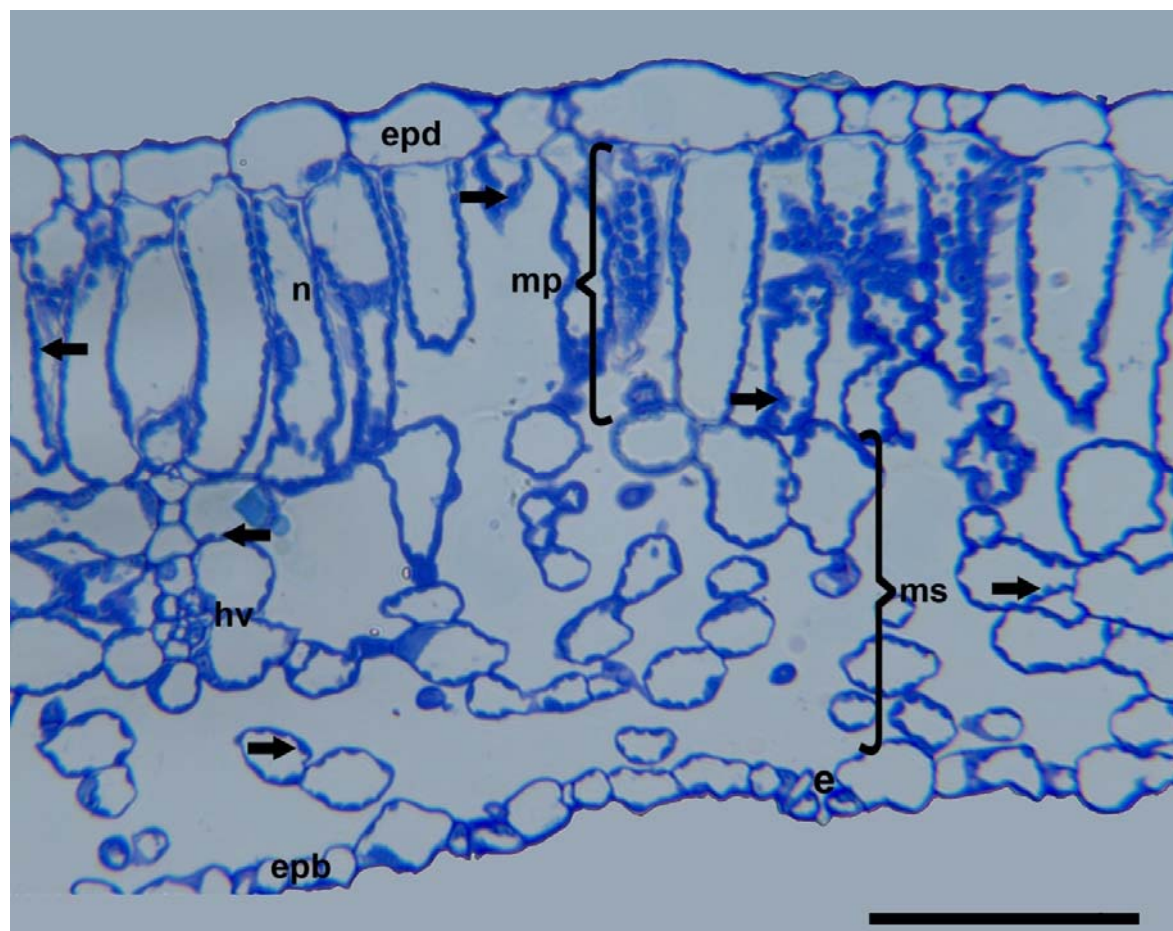


Figura 23. Corte semifino (2  $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa (*S. tuberosum*) var. Tollocana en estado verde (46 SPAD), epb: epidermis abaxial; epb: epidermis adaxial; mp: mesófilo empalizada, ms: mesófilo esponjoso, t: tricoma, e: estoma; n: núcleo; hv: haz vascular; las flechas indican a los plastidios. La barra=100  $\mu\text{m}$ .



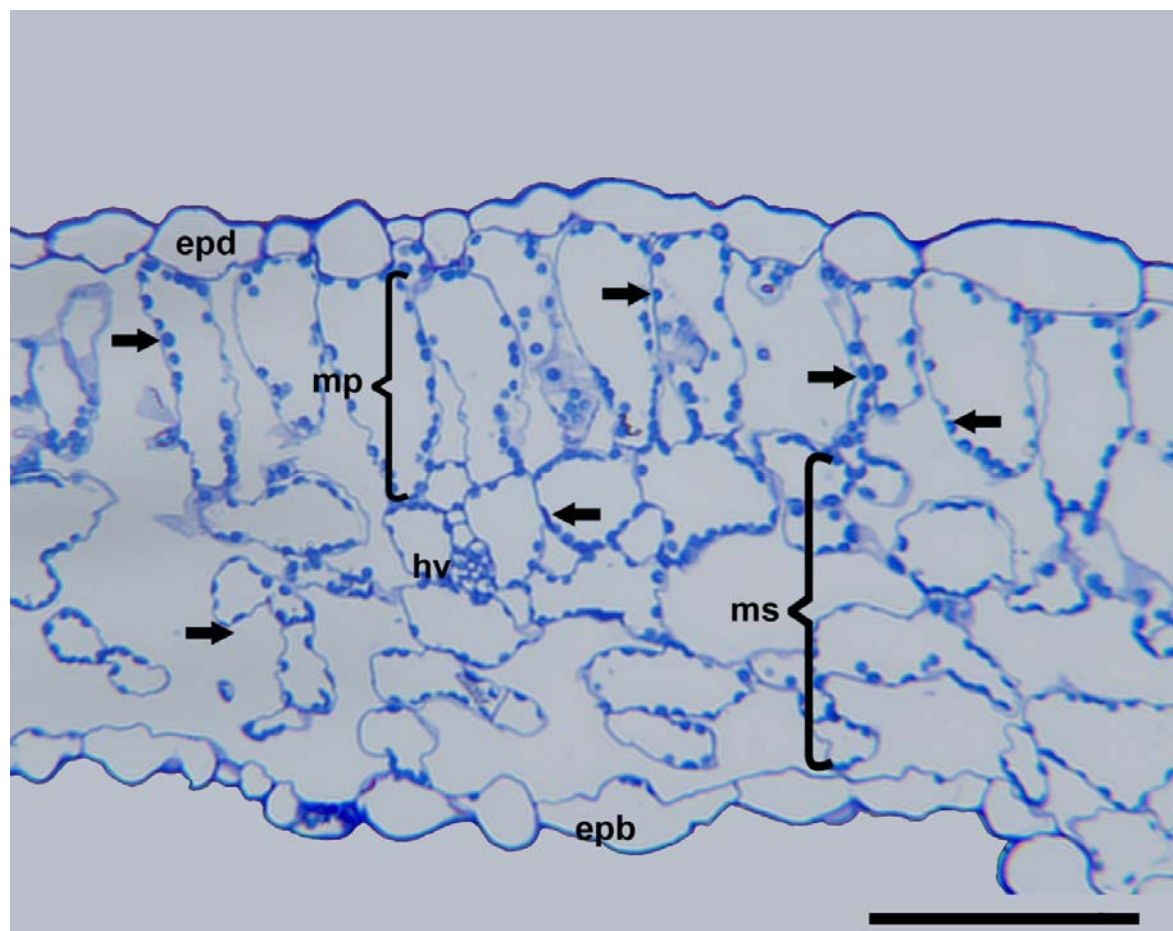


Figura 24. Corte semifino (2  $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa (*S. tuberosum*) var. Tollocan en estado inicial de senescencia (S1: 22 SPAD), epb: epidermis abaxial; epd: epidermis adaxial; mp: mesofilo empalizada, ms: mesófilo esponjoso, t: tricoma, e: estoma; n: núcleo; hv: haz vascular; las flechas indican a los plastidios. La barra=100  $\mu\text{m}$ .

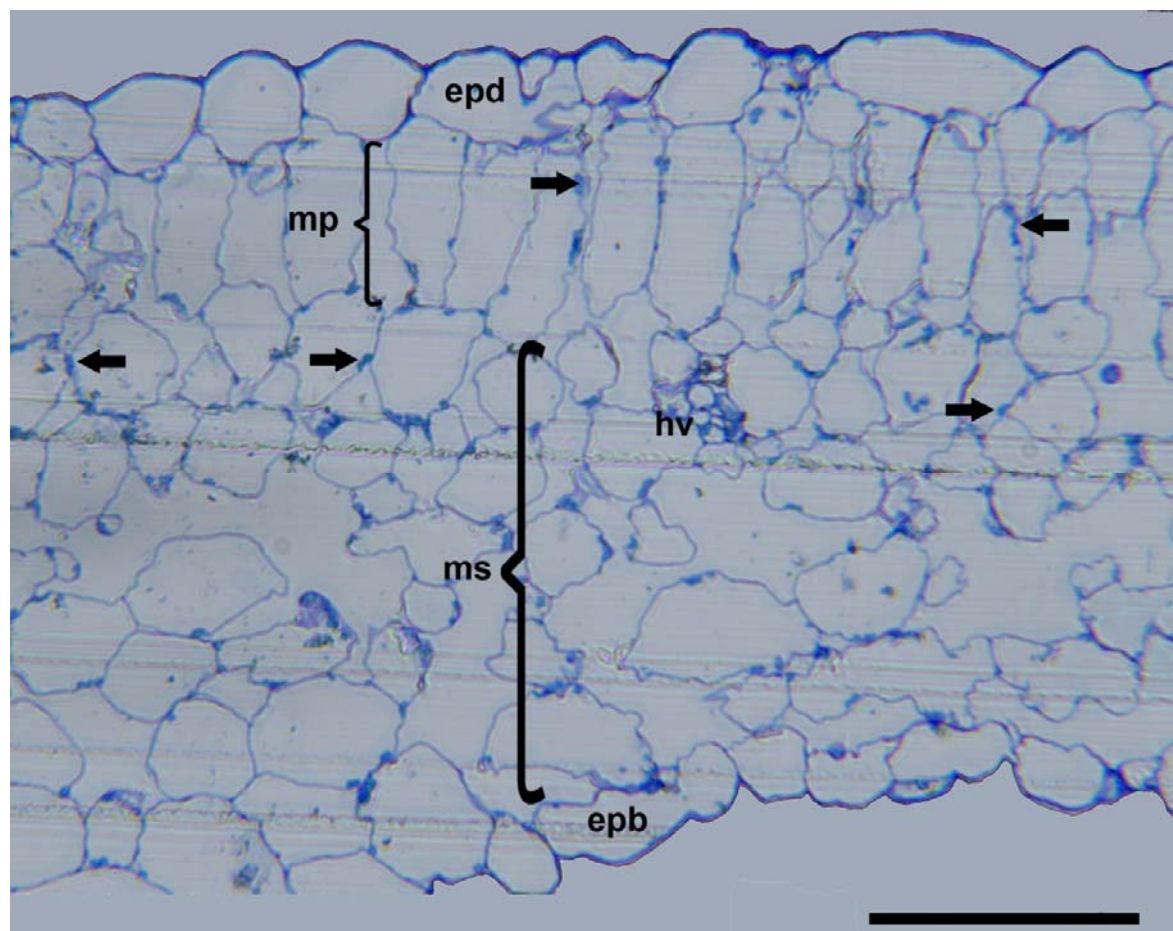


Figura 25. Corte semifino (2  $\mu\text{m}$ ) del foliolo terminal de la hoja de papa (*S. tuberosum*) var. Tollocan en estado avanzado de senescencia (S2: 6\_SPAD), epb: epidermis abaxial; epd: epidermis adaxial; mp: mesofilo empalizada; ms: mesófilo esponjoso; t: tricoma; e: estoma; n: núcleo; hv: haz vascular; las flechas indican a los plastidios. La barra=100  $\mu\text{m}$ .

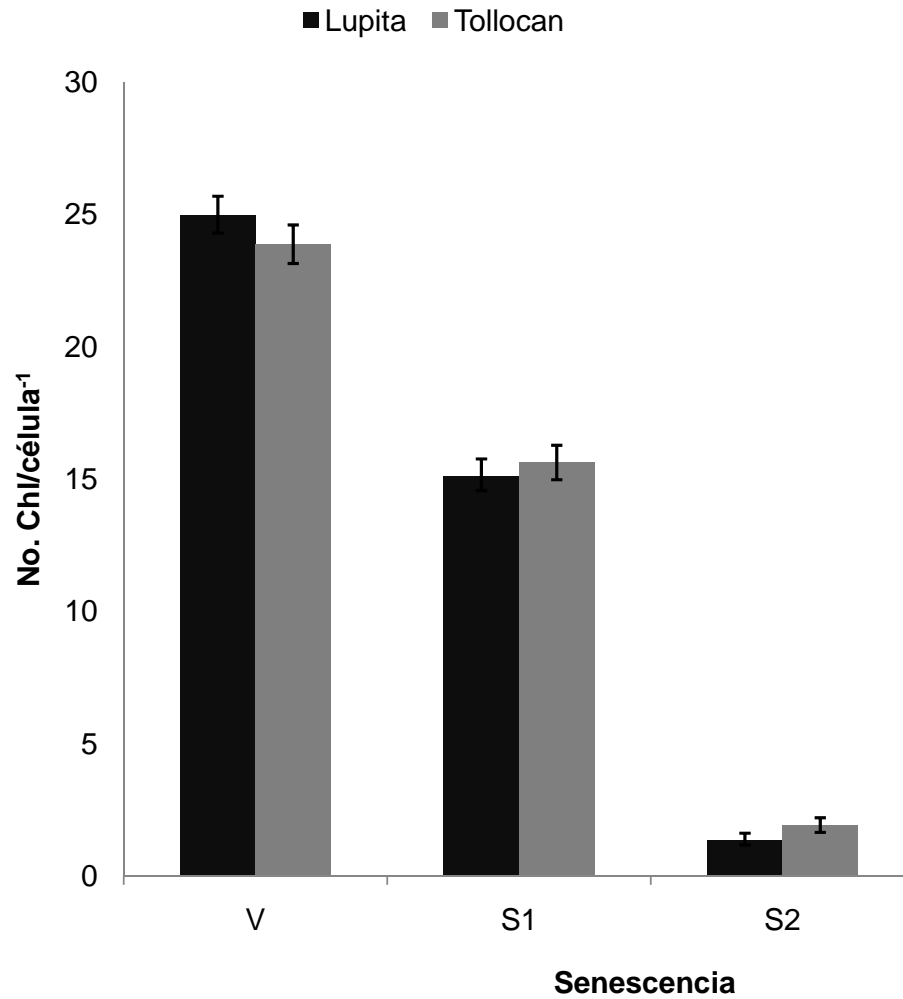


Figura 26. Población de plastidios durante la senescencia foliar de las variedades Lupita y Tollocan. Los datos son promedio  $\pm$  E.S.,  $n=60$ . (\*) Denotan diferencias significativas entre estados de desarrollo para cada variedad ( $p \leq 0.05$ ). V  $\geq 45$  SPAD; S1: 23-26 SPAD, S2:  $\leq 5$  SPAD.

### 6.3 Integridad del ADN

Los resultados de la electroforesis en geles de agarosa, no presentaron deterioro o fraccionamiento del ADN en ambas variedades. El gel muestra que las bandas de ADN de las muestras tuvieron valores mayores a los de referencia empleados (1500 pb). Esto evidencia que el ADN de los núcleos, al menos en estas fechas de muestreo (39, 50, 72 y 93 DDS) y bajo las condiciones de invernadero, no se fragmentaron. Cabe señalar que se realizaron cinco repeticiones de los geles y en todos los casos fue consistente el patrón de ADN, sin embargo en los cortes no se observaron núcleos en la última fecha de muestreo (93 DDS). Estos resultados podrían explicarse porque los cortes fueron delgados (2  $\mu\text{m}$ ) y no permitieron observar a la célula completa, por lo que no fue posible observar cuantos núcleos habían por área de tejido y la forma que tenían antes de morir la hoja. Para estudiar los núcleos *in situ* se requiere realizar cortes posteriores a estas fechas de muestreo para conocer si existe fraccionamiento del ADN.

Según estos datos el ADN se mantiene íntegro durante los primeros 93 DDS a pesar de que los niveles de clorofila disminuyeron drásticamente y la población de plastidos también lo hizo (2 plastidios/célula). Se requiere observar estados más avanzados de senescencia para observar cómo se deterioran los núcleos y cómo ocurre el fraccionamiento, implementando una prueba de TUNEL que detecta fragmentos de 180 bp o múltiplos de éste, pero en cortes gruesos (10  $\mu\text{m}$ ). Durante el ciclo biológico de ambas variedades, se propone que en los geles de agarosa no se detectaron diferencias cualitativas, debido a que éstos revelaron que el ADN estaba aún íntegro (Figura 27).



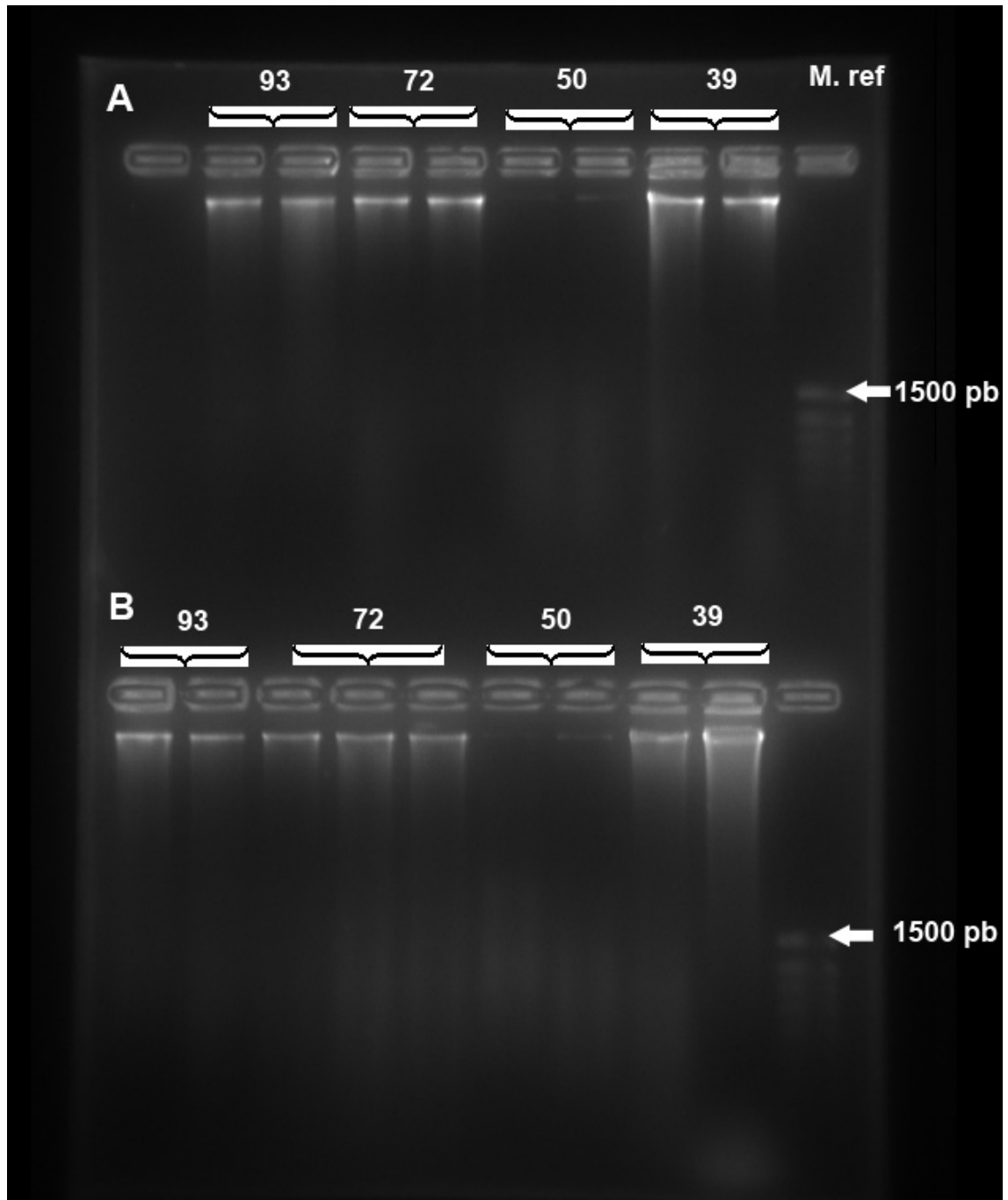


Figura 27. Análisis de ADN en gel de agarosa. Variedades Lupita (A) y variedad Tollocan (B). Los números 39, 50, 72 y 93 DDS, M. ref. = marcador de referencia.

## **Anatomía de la hoja**

Los cortes semifinos de las variedades estudiadas mostraron una epidermis tabular con células altas ( $63 \pm 7 \mu\text{m}$ ) y bajas ( $24 \pm 3 \mu\text{m}$ ) esta estructura concuerda con la descripción de *S. tuberosum* var. Russet Burbank realizada por McCauley y Evert (1988), aunque estos autores no mencionan el tamaño celular. Existen pocas diferencias anatómicas entre las variedades; la var. Lupita presenta hojas más delgadas ( $181 \pm 30 \mu\text{m}$ ) que Tollocan ( $256 \pm 8 \mu\text{m}$ ), y la var. Russet Burbank estudiada por McCauley y Evert (1988) con  $271 \mu\text{m}$ . La hoja de papa es bifacial (no es simétrica visto el corte transversal), las células de parénquima en empalizada forman un estrato de células alargadas ( $83 \mu\text{m}$ ) en Lupita y Tollocan, datos que concuerdan con los de la var. Russet Burbank ( $85 \mu\text{m}$ ), de acuerdo a McCauley y Evert (1988). El parénquima empalizada representó un tercio del grosor de la lámina, sólo en la var. Tollocan. Las células del parénquima en empalizada no son compactas, se menciona que esta característica es una ventaja para la difusión del  $\text{CO}_2$ , durante la fotosíntesis (Mauseth, 2003).

El parénquima esponjoso de la var. Lupita fue más compacto ( $97 \pm 6 \mu\text{m}$ ), que el de la var. Tollocan ( $187 \pm 8$ ). Estas diferencias estuvieron determinadas por el número de estratos y volumen de los espacios intercelulares. La forma de estas células es irregular con diámetros de 6 a  $24 \mu\text{m}$ . El parénquima esponjoso de la var. Lupita está formado por 4 estratos y el de la var. Tollocan de 5-6 estratos. En corte transversal la var. Tollocan presentó una mayor área de espacios intercelulares.

Se menciona que el haz vascular es bicolateral, con xilema central y floema hacia el haz y hacia el envés; la función de esta estructura es que el floema adaxial sirve para mandar fotosintatos a la hoja, mientras que la abaxial para exportar de la hoja hacia otras partes de la planta. El parénquima esponjoso es ramificado, pero las que se encuentran cerca de las empalizadas son menos ramificadas y llegan a formar una capa

conocida como células colectoras. En las células colectoras y empalizadas se encuentran los gránulos de almidón (McCauley y Evert, 1988).

Los plastidios de las hojas en estado S1 se observaron más redondeados que los cloroplastos de las hojas verdes; esta tendencia corresponde a lo descrito previamente en tabaco, *Nicotiana rustica* (Zavaleta *et al.*, 1999) y en trigo, *Triticum aestivum* (Zavaleta *et al.*, 2007). La mayoría de los plastidios se concentraron en las células en empalizadas, aunque también se distribuyen en las células del parénquima esponjoso, pero en menor cantidad (Figura 20 y 23). La comparación de medias del número de cloroplasto entre variedades no indicó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), lo cual podría señalar que la diferencia en la concentración de clorofilas se debe a diferencias entre las variedades y concentración de clorofila por cloroplasto. En cuanto a la abundancia de éstos se demostró una tendencia hacia la pérdida de plastidios durante la senescencia (Figura 22 y 25). En el estado avanzado de senescencia (S2) con valores menores a 5 SPAD se observó una pérdida casi completa de plastidios, mientras que los núcleos se observaron en algunas células. Sería necesario realizar un estudio con microscopía electrónica de transmisión para estudiar los cambios subcelulares durante la senescencia entre las variedades y así como detectar los cambios estructurales del núcleo previos a su degradación.

### **Integridad del ADN**

El análisis de los geles de agarosa en Lupita y Tolloca mostraron que la molécula de ADN se mantuvo íntegra hasta los 93 DDS, sin evidencia de degradación, observándose una sola banda en cada carril. Es posible que la degradación del ADN suceda en estadios más avanzados de senescencia. En contraste, en las células animales se reporta una primera fase donde se forman fragmentos de 50 kbp, y en una segunda

fase en la que se detectan fragmentos de 200 bp (Yamada *et al.*, 2006; Torriglia *et al.*, 1995). En el caso de las plantas se han reportado dos tipos de patrones: 1) el primero presenta el mismo bandeo típico de fragmentación de ADN que las células animales, y 2) un segundo patrón que se caracteriza por la ausencia del apilamiento de fragmentos de ADN (Yamada *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en papa concuerdan con el segundo patrón por la ausencia de fragmentación a los 93 DDS, posteriormente la planta murió debido al frío de la temporada y con ello la senescencia se aceleró (Figura 25). Buchanan-Wolfe *et al.* (2005) menciona que el bandeo típico del ADN, durante la degradación del núcleo, ocurre con poca frecuencia en las hojas senescentes, en cambio en los pétalos de *Petunia*, *Argyranthemum* y *Antirrhinum* se ha demostrado la aparición del bandeo típico de ADN, evidencia del fraccionamiento (Yamada *et al.*, 2006). Otro método para la detección del fraccionamiento del ADN es la prueba de TUNEL *in situ*, con la que puede detectarse el fenómeno en cortes de tejidos.

## 7 . C O N C L U S I O N E S

La anatomía foliar de las variedades estudiadas fue similar, con excepción del grosor de la lámina. La var. Tollocan ( $256 \pm 8 \mu\text{m}$ ), presentó hojas más gruesas que la var. Lupita ( $181 \pm 30 \mu\text{m}$ ), debido a un mayor número de estratos (5-6) del parénquima esponjoso y mayores espacios intercelulares.

No se observaron diferencias significativas en el número de cloroplastos por célula en las variedades estudiadas, los altos en la var. Lupita indican que los cloroplastos en ésta son más ricos en clorofila que los de la var. Tollocan.

Hasta los 93 DDS no se encontró fraccionamiento en el ADN, sin embargo tampoco se encontraron núcleos en los cortes realizados en esta fecha de muestreo en las dos variedades estudiadas.

En los estadios de senescencia estudiados, las variedades Lupita y Tollocan de papa no presentaron fraccionamiento de su ADN durante la tuberización y senescencia hasta los 93 DDS. Se requiere de un análisis del DNA en estadios más avanzados de senescencia ( $>93 \text{ DD}$ ,  $< 6 \text{ SPAD}$ ) para determinar si el fraccionamiento del DNA sucede o no previo a la necrosis de la hoja.

## 8 . L I T E R A T U R A   C I T A D A

- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89: 1113-1121.
- Buchanan-Wollaston, V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathas, S. Navabpour, T. Page, and D. Pink. 2003. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1: 3-22.
- Buchanan-Wollaston<sup>1</sup>, V., T. Pagel, E. Harrison, E. Breeze<sup>1</sup>, P. O. Lim, H. G. Nam, J. Lin, S. Wu, J. Swidzinski, K. Ishizaki, and C. J. Leaver. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 42: 567-585.
- Coupel, S. A., L. M. Watson, D. J. Ryan<sup>1</sup>, T. T. Pinkney, and J. R. Eason. 2004. Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. *Journal of Experimental Botany* 55: 59-68.
- Danon, A., V. Delorme, N. Mailhac, and P. Gallois. 2000. Plant Programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 647-655.
- FAO. 2008. Nueva luz sobre un tesoro enterrado. Roma. 148 p.
- Gepstein, S. 2004. Leaf senescence - not just a 'wear and tear' phenomenon. *Genome Biology* 5:212.
- Gladish, D. K., J. Xu, and T. Niki. 2006. Apoptosis-like programmed cell death occurs in procambium and ground meristem of pea (*Pisum sativum*) root tips exposed to sudden flooding. *Annals of Botany* 97: 895-902.

- Hensel L. L., V. Grbic, D. A. Baumgarten, and A. B. Bleecker. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 5:553-564.
- Hörtensteiner, S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *The annual Review of Plan Biology* 57: 55-77.
- Jackson, S. D. 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* 119:1-8.
- Jordán, J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22:100-106.
- Keech, O., E. Pesquet, A. Ahad, A. Askne, D. Nordvall, S. Munender V., H. Tuominen, V. Hurry, P. Dizengremel, and P. Gardeström. 2007. The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell and Environment* 30: 1523-1534.
- Krishnamurthy, K. V., R. Krishnaraj, R. Chozhavendan, and F. S. Christopher. 2000. The program of cell death in plants and animals – A comparison. *Current Science* 79: 1169-1181.
- Langston, B. J., S. Bai, and M. L. Jones. 2005. Increases in ADN fragmentation and induction of a senescence-specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias. *Journal Experimental of Botany* 56: 15-23.
- Larcher, W. 2001. *Physiological Plant Ecology*. 4th edition. Springer-Verlag, Germany pp: 34-56.
- Lin, J., and S. Wu. 2004. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* 39: 612-628.
- McCauley, M. M., and R. F. Evert. 1998. The anatomy of the leaf of potato, *Solanum tuberosum* L. 'Russet Burbank'. *Botanical Gazette* 149: 179-195.

- Mauseth, J. D. 2003. *Biology an introduction to plant biology*. Jones and Bartlett. U.S.A. P 847.
- Martínez-Gutiérrez, R., H.A. Zavaleta-Mancera, L.M. Ruíz-Posadas, A. Delgado-Alvarado y R. Vaca-Paulin. (2008). Intercambio de gases y relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo (*Triticum aestivum* L.) por citocinina BAP. *Interciencia* 33 (2):1-6
- Mittler, R., L. Simon, and E. Lam. 1997. Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Journal of Cell Science* 110: 1333-1344.
- Mora H, M. E., H. A. López D. 2006. Tolerancia a baja temperatura por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista de Fitotecnia Mexicana*: 29:81-85.
- Pagoria, D. A., and N. Maravolo. 2005. DNA fragmentation in *Marchantia polymorpha* thalli in response to spermine treatment. *International Journal of Plant Sciences* 166: 589-594.
- Palavan-Unsal, N., E. Buyuctuncer, and M. Tufekci. 2005. *Journal of Cell and Molecular Biology* 4: 9-23.
- Pyung, O. L., H. J. Kim, and H. G. Nam. 2007. Leaf Senescence. *The Annual Review of Plant Biology* 58: 115-136.
- Ryun, W. H., K. M. Chung., J. Park, S. Aeong, T. Ahn, S. H. Hong, S. K. Jang, and H. G. Nam. 2001. ORE9, an F-Box Protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 1779-1790.
- Rogers, H. 2006. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annals of Botany* 97: 309-315.
- Scheeler, P. 1993. *Biología Celular*. Limusa. México, D.F. pp. 443-446.



- Smart, C. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* 126: 419-448.
- Teixeira, J., S. Pereira, F. Cánovas, and R. Salema. 2005. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *Journal Experimental of Botany* 56: 663-671.
- Van Doorn, W. G. 2005. Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends in Plant Science* 10: 478-482.
- Van Doorn, W. G., and E. J. Woltering. 2004. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *Journal of Experimental Botany* 55: 2147-2153.
- Vranová, E., D. Inzé, and V. Breusegem. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227-1236.
- Wagstaff1, C., U. Chanasut, F. J. M. Harren, L. Laarhoven, B. Thomas, H. J. Rogers, and A. D. Stead. 2005. Ethylene and flower longevity in *Alstroemeria*: relationship between tepal senescence, abscission and ethylene biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56: 1007-1016.
- Watanabe, M., D. Setogushi, K. Uehara, W. Ohtsuka, and Y. Watanabe. 2002. Apoptosis-like cell death of *Brassica napus* leaf protoplast. *New Phytologist* 156: 417-426.
- Wingler, A., E. Brownhill, and N. Pourtau. 2005. Mechanisms of the light-dependent induction of the cell death in tobacco plants with delayed senescence. *Journal Experimental of Botany* 56: 2897-2905.
- Willson-García, C. Y., H. A. Zavaleta-Mancera, H. López-Delgado, A. Hernández-Garay (2008) The cytokinin BAP delays senescence and increases antioxidants,

proteins and growth in orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) *Agrociencia* 42:799-806.

Xu, Y., and M. R. Hanson. 2000. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in *Petunia*. *Plant Physiology* 122: 1323-1333.

Xu, Q., and B. Huang. 2004. Antioxidant metabolism associated with summer leaf senescence and turf quality decline for creeping bent grass. *Crop Science* 44: 553-560.

Yamada T., K. Ichimura, and W. G. Van Doorn. 2006. ADN degradation and nuclear degeneration during programmed cell death in petals of *Antirrhinum*, *Argyranthemum*, and *Petunia*. *Journal of Experimental Botany* 57: 3543-3552.

Zavaleta-Mancera, H. A., H. López-Delgado, H. Loza-Tavera, M. Mora-Herrera, C. Trevilla-García, M. Vargas-Suárez, and H. Ougham. (2007). Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164:1572-1582.

Zavaleta-Mancera, H. A., B. J. Thomas, H. Thomas, and I. M. Scott. 1999. Regreening of senescence *Nicotiana* leaves. *Journal of Experimental Botany* 50: 1683-1689.