



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala



Efecto de inhibidores del transporte electrónico fotosintético  
sobre la tuberización de *Solanum tuberosum* var. alpha

TESIS PROFESIONAL  
para obtener el título de  
BIÓLOGO

PRESENTA:  
ANGEL PAZ SÁNCHEZ

Director: Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel  
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

La comprensión del mecanismo de formación de tubérculo en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) cuenta con varios detalles pendientes por aclarar, y a pesar de contar con evidencia de factores ambientales y endógenos que influyen en el proceso así como de los cambios fisiológicos que acompañan la aparición de tubérculos, aún se desconoce el evento clave encargado de desencadenar tan complejo proceso. Investigaciones al respecto han demostrado que compuestos fenólicos y sus derivados como cumarina, son efectivos inductores del proceso de tuberización y están presentes de manera natural en los tejidos de la papa, pero no se tiene certeza de cuál es el mecanismo de su participación. Recientemente se ha señalado que tales compuestos fenólicos presentan también actividad inhibitoria de la actividad fotosintética, específicamente sobre el transporte electrónico del fotosistema II, ante lo cual, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar si tal inhibición es un requisito en la inducción de tubérculos en *S. tuberosum*. Para ello se realizaron cultivos *in vitro* de brotes axilares en presencia de inductores conocidos (kinetina y cumarina) y un inhibidor de transporte electrónico (diuron) comparando sus efectos sobre la tuberización y sobre la actividad del fotosistema II bajo concentraciones ideales y limitantes de sacarosa. Los resultados mostraron que los inductores de tuberización empleados presentan actividad tuberizante similar y estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) pero un efecto sobre el transporte electrónico contrastante, siendo kinetina un inhibidor de flujo energético que impide el paso de electrones hacia la cadena transportadora de electrones y resaltando que cumarina se comportó como estimulante del rendimiento en fotoquímica primaria y del flujo electrónico hacia la cadena transportadora al ser aplicada en medio con 3% de sacarosa, efecto reversible cuando se incrementa la concentración de sacarosa al 6%; mientras tanto diuron efectivamente inhibió el transporte electrónico hacia la cadena transportadora pero no indujo un nivel de tuberización significativo como kinetina y cumarina, a pesar de haber originado plántulas con algunas características propias de los cambios fisiológicos que preceden a la formación de tubérculos. Se concluyó por tanto que la interrupción del transporte electrónico no es un evento indispensable o limitante para la inducción del proceso de formación de tubérculos y se propone en cambio, que la participación de cumarina pueda estar en función de su acción estimulante de la actividad fotosintética desencadenando procesos que culminan en la formación de tubérculos.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum*, tubérculo, fotosíntesis, cumarina, kinetina, diuron.

## ÍNDICE

Resumen	1
Índice de Figuras	3
Abreviaturas	5
Dedicatoria	7
Introducción	9
Antecedentes	26
Hipótesis	28
Objetivos	28
Material y método	29
Resultados	32
Discusión	61
Conclusiones	79
Agradecimientos	80
Referencias	81
Anexo I	87
Anexo II	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Aspecto general de *S. tuberosum* a) Tubérculo, b) Vástago, c) Inflorescencia, d) Frutos
- Figura 2.-** Distribución de las poblaciones silvestres registradas de *S. tuberosum* en América.
- Figura 3.-** Morfología de la planta de papa.
- Figura 4.-** Esquemas del tubérculo de papa: a) Vista externa, b) Vista interna longitudinal
- Figura 5.-** Nutrientes contenidos por cada 100g de papa cruda
- Figura 6.-** Etapas iniciales de formación del tubérculo. a) Estolón normal b) y c) inicio de la formación del tubérculo
- Figura 7.-** Localización de los cloroplastos. (a) Hoja, (b) Vista transversal de la hoja, (c) esquema de una célula del mesófilo, (d) Cloroplasto.
- Figura 8.-** (a) Esquema de un cloroplasto. (b) Acercamiento a una grana y tilacoide vistas transversalmente. (c) Agrupaciones de clorofilas (Fotosistemas) contenidas en la membrana
- Figura 9.-** Ubicación del espectro de luz visible dentro del espectro electromagnético, y longitudes de onda correspondientes a los colores
- Figura 10.-** Estructura química de las clorofilas a y b.
- Figura 11.-** Estructura química del  $\beta$ -caroteno, carotenoide más abundante de la naturaleza y espectro de absorción de los pigmentos presentes en cloroplastos
- Figura 12.-** Centros de reacción y complejos antena de los fotosistemas
- Figura 13.-** Fotosistemas y complejos proteínicos embebidos en la membrana del tilacoide en los cloroplastos, a través de los cuales ocurre la captación y transporte electrónico
- Figura 14.-** Fotones de luz solar son captados por el complejo antena en los fotosistemas y la energía es transferida al centro de reacción
- Figura 15.-** Esquema general del proceso de transporte electrónico desde la captación de energía luminosa hasta la generación de NADPH
- Figura 16.-** Cinética de fluorescencia de la clorofila a (Derecha) y su correspondencia con los eventos de transporte electrónico durante la fase rápida de la fotosíntesis.
- Figura 17.-** Porcentaje de tuberización en *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos
- Figura 18.-** Cantidad y peso promedio de los tubérculos producidos en *S. tuberosum* según los diferentes tratamientos
- Figura 19.-** Promedio de altura de *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos
- Figura 20.-** Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo in vitro con 3% de sacarosa (Control) a los 30 días de crecimiento
- Figura 21.-** Plántulas de *S. tuberosum* a los 30 días de crecimiento en cultivo in vitro con 3% de sacarosa más tratamientos

**Figura 22.-** Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo in vitro con 3% de sacarosa y cumarina a concentración alta (342.23  $\mu$ M).

**Figura 23.-** Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo in vitro con 3% de sacarosa y diuron

**Figura 24.-** Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo in vitro con 6% de sacarosa

**Figura 25.-** Plántula de *S. tuberosum* en cultivo in vitro con 6% de sacarosa y cumarina.

**Figura 26.-** Plántula de *S. tuberosum* en cultivo in vitro con 6% de sacarosa y diuron.

**Figura 27.-** Concentración de Clorofila a, b y carotenoides en *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos

**Figura 28.-** Índices de la relación Clorofila a/b (a) y Clorofilas/Carotenoides (b) en *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos.

**Figura 29.-** Fluorescencia variable relativa de *S. tuberosum* en presencia de diferentes tratamientos en Medio C

**Figura 30.-** Comparación de la emisión de fluorescencia relativa de *S. tuberosum* entre grupos control de ambos medios de cultivo.

**Figura 31.-** Fluorescencia variable relativa de *S. tuberosum* en presencia de diferentes tratamientos en Medio S respecto al control C

**Figura 32.-** Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de cumarina respecto al control y kinetina (medio C).

**Figura 33.-** Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de diuron respecto al control y kinetina (medio C).

**Figura 34.-** Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de cumarina respecto al control C y kinetina (medio S).

**Figura 35.-** Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de diuron respecto al control C y kinetina (medio S).

**Figura 36.-** Comparación de rendimientos cuánticos de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control y kinetina (sacarosa 3%).

**Figura 37.-** Comparación de rendimientos cuánticos de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control C y kinetina (sacarosa 6%).

**Figura 38.-** Comparación de flujos de energía por centro de reacción (a), por área activa (b) y rendimientos cuánticos (c) de *S. tuberosum* en medio C y medio S.

**Figura 39.-** Modelo de hoja de los flujos de energía por área transversal de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control y kinetina (medio C)

**Figura 40.-** Modelo de hoja de los flujos de energía por área transversal de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control y kinetina (medio S)

## ABREVIATURAS

### Unidades de medición

nm	nanómetros
cm	centímetros
mm	milímetros
μs	microgramos
mg	miligramos
g	gramos
t	toneladas
Ha	hectárea
μs	microsegundos
ms	milisegundos
seg	segundos
mL	mililitros
μM	micromolar
kcal	kilocalorías
mg/L	miligramos por litro
μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	micromoles por metro cuadrado sobre segundo
°C	grados Celsius/centígrados

### Moléculas, compuestos y estructuras

ATP	adenosín trifosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Mg <sup>2+</sup>	magnesio
O <sub>2</sub>	oxígeno
QA	quinona A
QB	quinona B
QH <sub>2</sub>	plastohidroquinina
e <sup>-</sup>	electrón
PSII	fotosistema II
PSI	fotosistema I
GA	giberelina
DCMU	diclorofenil-dimetilurea (duron)

### Cultivos

var.	variedad
CIP	Centro Internacional de la Papa
Medio C	medio de cultivo con 3% de sacarosa
Medio S	medio de cultivo con 6% de sacarosa
C1	cumarina en concentración de 102.66 μM
C2	cumarina en concentración de 171.11 μM
C3	cumarina en concentración de 342.23 μM
D1	diuron en concentración de 102.66 μM
D2	diuron en concentración de 171.11 μM
D3	diuron en concentración de 342.23 μM

### Transporte electrónico

ABS/RC	absorción por centro de reacción del fotosistema II
TRO/RC	atrapamiento por centro de reacción del fotosistema II

- ETo/RC transferencia por centro de reacción del fotosistema II
- DIo/RC disipación por centro de reacción del fotosistema II
- $\phi P_0$  rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria
- $\phi E_0$  probabilidad de que un fotón mueva un electrón hacia la cadena transportadora de electrones
- $\psi_0$  probabilidad de que un excitón mueva un electrón más allá de QA
- ABS/Cso absorción por área activa o sección transversal de hoja
- TRo/Cso atrapamiento por área activa o sección transversal de hoja
- ETo/Cso transferencia por área activa o sección transversal de hoja
- DIo/Cso disipación por área activa o sección transversal de hoja
- RC/Cso centros de reacción activos por área activa o sección transversal

## **DEDICATORIA**

*Para mi mamá, Clara Sánchez Rangel:*

*La mejor parte de mí es un reflejo de todo el amor, fuerza, paciencia, dedicación e inteligencia con que me guías y apoyas todos los días*

*Este logro pertenece a ambos porque es el resultado de todo un camino de esfuerzo, desvelos, aprendizaje y alegrías, que han estado presentes y hemos compartido desde un inicio, mucho antes de esta tesis y mucho antes de la biología.*

*Gracias por acompañarme siempre y por enseñarme a plasmar en todo lo que hagamos, lo mejor de nosotros.*

*Te quiero mucho mamá.*

*“Nuestras ideas deben ser tan amplias como la naturaleza*

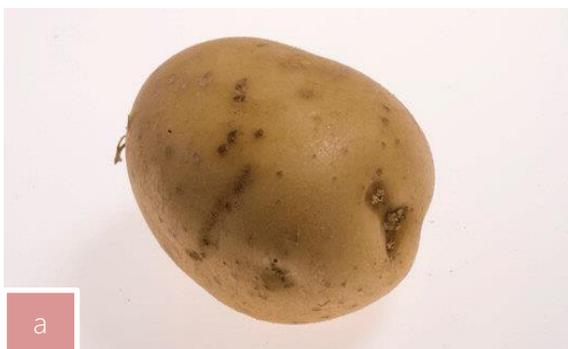
*si aspiran a interpretarla”*

- Sir Arthur Conan Doyle  
(Estudio en Escarlata, 1887)

## INTRODUCCIÓN

### La Papa y su taxonomía

La planta de papa (Fig. 1) recibe el nombre científico de *Solanum tuberosum* (L., 1753) y presenta la siguiente clasificación taxonómica de acuerdo a la base de datos Tropicos en 2013:



Clase: Equisetopsida (C. Agardh)  
Subclase: Magnoliidae (Novák ex Takht.)  
Superorden: Asteranae (Takht.)  
Orden: Solanales (Juss. ex Bercht. & J. Presl)  
Familia: Solanaceae (Juss.)  
Género: *Solanum* (L.)

Los sinónimos para *S. tuberosum* registrados hasta la fecha son los siguientes: *Solanum andigenum* (Juz. & Bukasov), *S. andigenum* subsp. *aya-papa* (Bukasov & Lechn.), *S. andigenum* subsp. *bolivianum* (Lechn.), *S. andigenum* subsp. *ecuatorianum* (Lechn.), *S. andigenum* var. *stenophyllum*, *S. kesselbrenneri* (Juz. & Bukasov), *S. subandigena* (Hawkes), *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (Tropicos, 2013; The Plant List, 2010).



Figura 1.- Aspecto general de *S. tuberosum*: a) Tubérculo, b) Vástago, c) Inflorescencia, d) Frutos.  
(Fotos: McRobb A., 2008; Mrkvica A., 2013 y Fontanella F., 2013)

## Distribución silvestre

Existen alrededor de 187 especies silvestres de papa que son los ancestros originales de la especie cultivada actualmente. Estas crecen en suelos, altitudes y climas variados, desde los desérticos a lo largo de la costa peruana hasta los valles inter-andinos por encima de los 4,200 msnm. Se distribuyen geográficamente desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sureste de Chile (Fig. 2), siendo Perú y Bolivia los países donde la mayoría de las especies están concentradas (CIP, 2013). Existen reportes de organismos silvestres presentes en Sudáfrica y Madagascar en el continente africano e inclusive en el asiático en China (Tropicos, 2013). En cuanto a su hábitat, se adapta bien a las regiones montañosas, templadas y subtropicales. Se cultiva en regiones templadas y subtropicales a través del mundo y se piensa que pudo haberse originado en la región de los Andes en Sudamérica y probablemente domesticado primero en la región del lago Titicaca en Perú y Bolivia hace unos 10,000 a 7,000 años. (KEW, 2013).



Figura 2.- Distribución de las poblaciones silvestres registradas de *S. tuberosum* en América. (Ilustración: CIP - Wild Potato Species Atlas, 2013).

## Descripción botánica

La planta de *S. tuberosum* es una hierba erecta, perenne y aromática que va de los 30 cm a 1 m de altura o más (Fig. 3), escasamente pilosa, con estolones subterráneos portadores de tubérculos (brotes vegetativos). Presenta tallos erectos, succulentos, y ramificados. Las hojas son compuestas y presentan de 3 a 5 pares de folíolos. Sus flores bisexuales pueden ser blancas, rosas, púrpuras o azuladas, de aproximadamente 2.5cm de diámetro con anteras amarillas y sujetadas a una inflorescencia axilar multifloreada, cada flor nace de un pedicelo de 2 a 3 cm de largo. Los frutos son bayas esféricas succulentas, no comestibles, de color amarillo-verdoso a púrpuras de hasta más de 4cm de diámetro. Miles de variedades/cultivares existen, entre los cuales es posible encontrar variedad en características tales como el tamaño del tubérculo, la forma y el color de la piel. (Tapia & Frías, 2007; KEW, 2013).

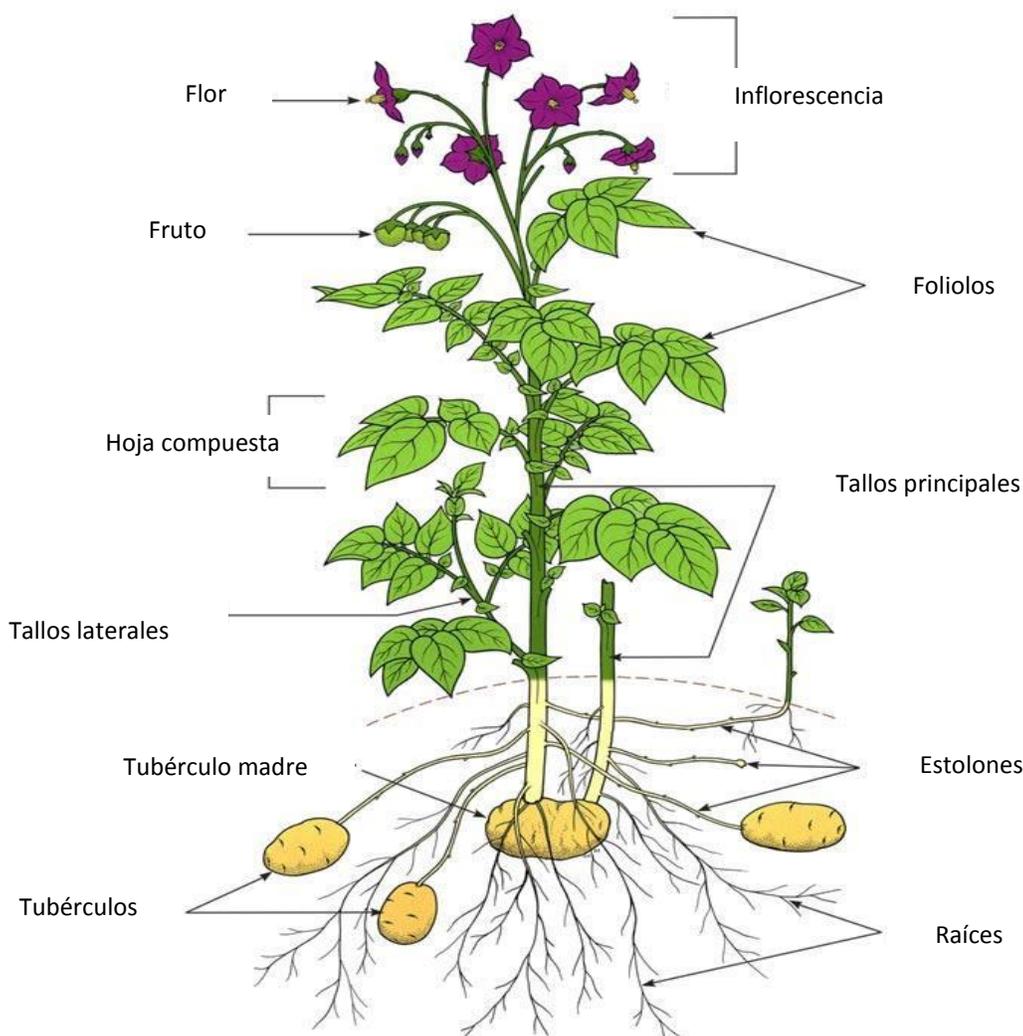


Figura 3.- Morfología de la planta de papa.  
(Ilustración: CIP – Como crece la papa, 2013).

## Tubérculo

Los tubérculos son tallos modificados y constituyen los órganos de reserva de la planta (principalmente de almidón) y varían en tamaño, forma y color de piel y pulpa (Fig. 4). A lo largo de todo el cuerpo del tubérculo están presentes estructuras comúnmente conocidas como "ojos" del tubérculo donde se encuentran dispuestas yemas axilares laterales rebordeadas por la cicatriz de una escama, cuyos entrenudos no se han desarrollado porque permanecen latentes hasta el momento en que son capaces de desarrollar un nuevo estolón del cual se puede originar una nueva planta. El tubérculo tiene una yema terminal en la extremidad apical denominada "corona", y en el otro extremo llamado "talón" se encuentra el punto de unión del estolón conocido como "ombligo".

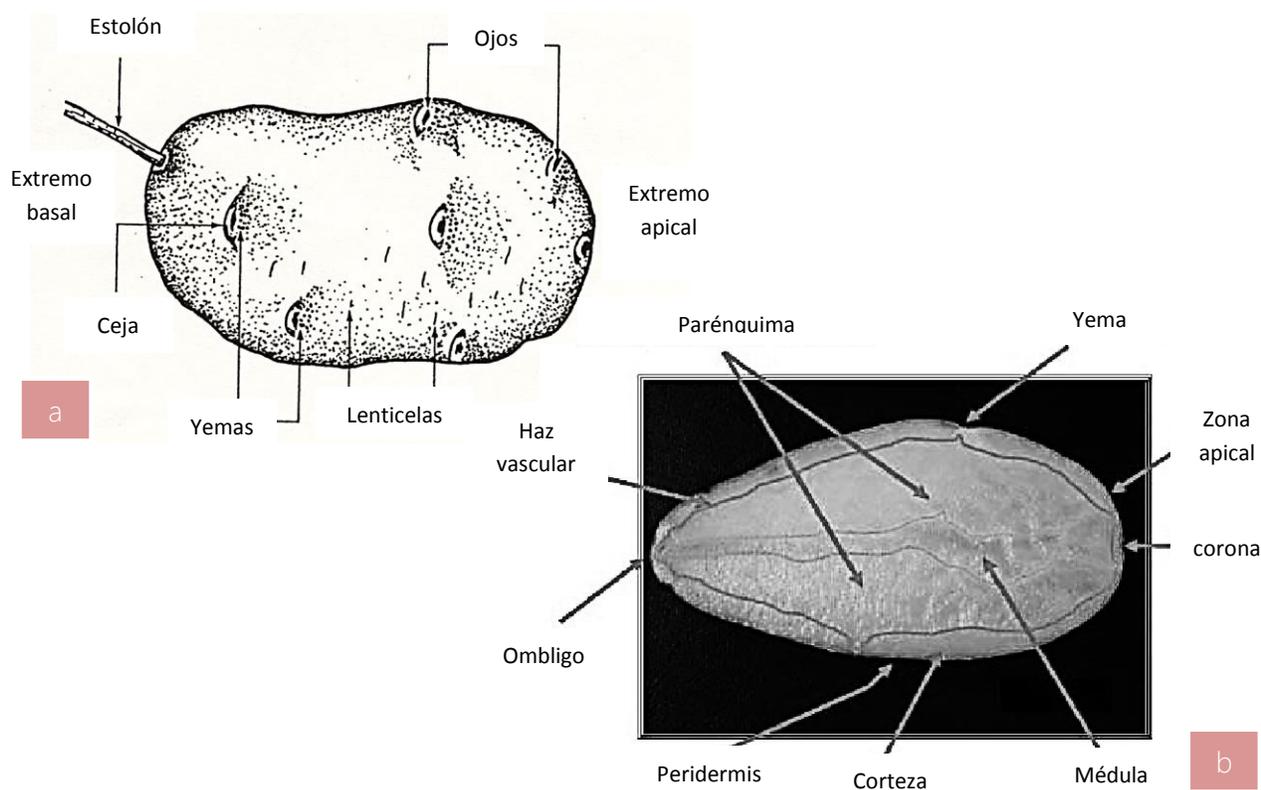


Figura 4.- Esquemas del tubérculo de papa: a) Vista externa, b) Vista interna longitudinal. (Ilustraciones: Aldabe & Dogliotti, 2011 y Fueyo, 2007).

Desde el punto de vista anatómico, en vista longitudinal se observa del exterior hacia el interior, la peridermis mejor conocida como "piel", y debajo de ésta se encuentra la "pulpa" o "carne" la cual está comprendida por las siguientes zonas anatómicas y tejidos: la zona de la corteza

compuesta por parénquima cortical; el anillo vascular conformado por el floema, xilema y parénquima; y finalmente la médula constituida de células de parénquima. Los compuestos fenólicos en la papa están relacionados con el color de la papa cruda y químicamente es posible distinguir los siguientes tipos de compuestos fenólicos: lignina, antocianinas, flavonas, taninos, fenoles monohídricos, polifenoles, ácido clorogénico y cumarinas. (Aldabe & Doglotti, 2011; Vázquez *et al.*, 2012).

### **Variedad alpha**

Originalmente existen más de 4,300 variedades de papa con diversas formas y tamaños (CIP, 2013). A estas variedades se suman aquellas producidas artificialmente con la intención de generar individuos con características que les permitan ser resistentes a situaciones adversas durante el cultivo, principalmente contra plagas como el tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans* Mont.).

En México las variedades de papa que se cultivan con fines de consumo humano se pueden clasificar en tres grupos según el color y tipo de cáscara: 1) color rosado, 2) color blanco/amarillo y con cáscara lisa y 3) variedades de color rojo. Debido a que las variedades rosas y rojas se encuentran actualmente en declive por la falta de producción de semilla certificada y por la degeneración a causa de enfermedades, las variedades blancas/amarillas son las que se siembran con mayor frecuencia en todo el país con fines de consumo en fresco e industrial, y de entre las variedades blancas, se encuentra la variedad alpha como predominante en nuestro país (Vázquez *et al.* 2012), gracias a que cuenta con potencial de rendimiento de hasta 40 t/Ha y mucha aceptación en el mercado para consumo en fresco (Pérez-López *et al.*, 2007), motivos por los cuales ha constituido hasta el 40% de la superficie sembrada en el territorio nacional (Rubio *et al.*, 2000).

### **Valor en la alimentación y otros usos**

La papa es una materia prima mayor y tienen un lugar predominante en muchas cocinas nacionales. Son un producto alimenticio completo por sí mismo, proveyendo todos los nutrientes esenciales (Fig. 5) con excepción de calcio y vitaminas A y D (elementos que pueden ser obtenidos consumiéndolas con leche). Los diversos y adaptables tubérculos son preparados cocinados, rostizados, al horno, fritos y al vapor como vegetal, pero también son el ingrediente principal en

muchas sopas, guisos, tartas, y platillos al horno. También son procesadas para obtener una amplia gama de productos que incluyen papa fritas, papas a la francesa, hojuelas de papa, pan de papa, harina de papa y papas deshidratadas. Además son una fuente común de almidón, glucosa y dextrina e inclusive son usadas para producir bebidas alcohólicas incluyendo el vodka y aguardiente. También son usadas para alimentar otros animales (KEW, 2013) e inclusive el almidón de la papa se utiliza para la elaboración de papel, textiles, pegamentos. Por ello, la papa ocupa el tercer lugar en importancia para la alimentación humana en términos de consumo con más de 300 millones de toneladas de producción de *S. tuberosum* y compite por el primer sitio a lado del trigo, el maíz y el arroz (CIP, 2012).

Elemento	Contenido	Unidad	Elemento	Contenido	Unidad
Porción comestible	82	%	Fibra	0.5	g
Humedad	81.2	%	Vitamina B6	0.13	mg
Energía	76	kcal	Tiamina	0.1	mg
Potasio	412.6	mg	Zinc	traza	mg
Ácido ascórbico	15	mg	Rivoflavina	traza	mg
Calcio	13	mg	Folato	traza	mg
Hierro	2.7	mg	Magnesio	traza	mg
Proteínas	1.6	g	Fósforo	traza	mg
Niacina	1.1	mg	Almidón*	65-80	%

Figura 5.- Nutrientes contenidos por cada 100g de papa cruda (INEGI y USPB, 2012).

\* Porcentaje de almidón respecto al 100% de materia seca; su contenido varía respecto al estado de madurez del tubérculo y a las condiciones del medio. (Vázquez *et al.*, 2012).

## Fenología y Cultivo

La altura óptima para el cultivo de la papa *S. tuberosum* está entre los 2,000 y 3,800 msnm. Al igual que los demás cultivos extrae del agua, suelo y aire todos los minerales y elementos necesarios: hidrogeno, oxigeno, carbono, nitrógeno, fosforo, potasio como elementos mayores y micronutrientes tales como azufre, magnesio, hierro, manganeso, boro, zinc, cobre y molibdeno (Tapia & Fries, 2007).

Las etapas de crecimiento de la planta de papa pueden dividirse en cuatro de acuerdo a la siguiente propuesta de Kooman (1995):

- Fase 0: Va desde la plantación hasta el momento de emergencia.
- Fase 1: Abarca desde el momento de la emergencia hasta la iniciación de formación de los tubérculos (diferenciados). En esta etapa los asimilados disponibles se destinan al crecimiento de hojas, tallos, raíces y por último hacia los estolones.
- Fase 2: Se considera desde el inicio de la tuberización hasta el fin del crecimiento del follaje, momento en que el 90% de los asimilados en el día son destinados al crecimiento de los tubérculos
- Fase 3: Va desde que cesa el crecimiento foliar de la planta hasta que envejece completamente. El área foliar comienza a disminuir porque no hay desarrollo de hojas nuevas y las hojas viejas van muriendo, y el área foliar en conjunto va disminuyendo su eficacia. En esta etapa todos los asimilados disponibles se destinan a los tubérculos

Para información detallada sobre la situación del cultivo de papa en México durante los últimos 30 años véase *Anexo I*.

### **Proceso de tuberización**

La formación del tubérculo comienza cuando los tallos principales de la planta alcanzan un desarrollo suficiente, es decir, cuando la yema apical se diferencia en floral, y por lo tanto disminuye la dormancia apical, las yemas subterráneas del tallo que están más cerca del tubérculo madre brotan originando los estolones, los cuales crecen en longitud hasta que reciben estímulos para iniciar la tuberización. Al iniciar la tuberización (Fig. 6) cesa el crecimiento en longitud y se ensancha la región subapical del estolón. En el inicio se agranda solamente la región subapical de la pinta del estolón involucrando solamente un entrenudo y para posteriormente incorporar el segundo. En este estado, por la considerable expansión radial del tubérculo, el gancho se endereza y la yema apical del estolón queda situada en la posición terminal del tubérculo joven. El almacenamiento de reservas continúa incorporando nuevos entrenudos y es claro que los sucesivos hacia la corona se acortan en la medida que va disminuyendo el ritmo de crecimiento en longitud. La tuberización procede acropetalamente, involucrando alguna extensión longitudinal y una gran expansión transversal de los sucesivos

entrenudos. Esta forma de crecimiento tiene un componente genético que hace que las distintas variedades tengan distinta forma de tubérculos. (Aldabe & Dogliotti, 2011).

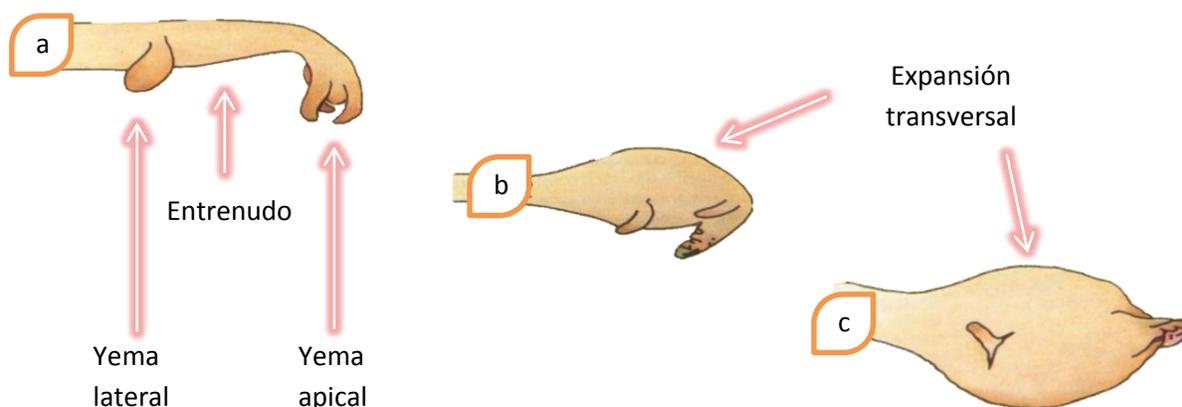


Figura 6.- Etapas iniciales de formación del tubérculo. a) Estolón normal b) y c) inicio de la formación del tubérculo. (Ilustraciones: Aldabe & Dogliotti, 2011).

La presente investigación involucra el estudio de eventos del proceso fotosintético en las plantas de papa, por lo que a continuación se describen las bases teóricas que permitan una mejor comprensión.

### Fotosíntesis y transporte electrónico

Como es sabido, las plantas se encargan de capturar la energía proveniente del sol y usarla como detonante para una serie de reacciones químicas que en conjunto conforman el proceso conocido como fotosíntesis del cual obtienen la energía para vivir. En las plantas superiores, la fotosíntesis ocurre gracias a que sus células contienen organelos llamados cloroplastos en los cuales tienen lugar las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis (Gracia, 2010).

### Componente celular: Cloroplasto

Anatómicamente las hojas poseen una zona intermedia llamada "mesófilo" (Fig. 7) compuesta principalmente por clorénquima (tejido de almacenamiento con capacidad fotosintética), gracias a que está constituido por varias capas de células ricas en cloroplastos (Raven *et al.*, 2011).

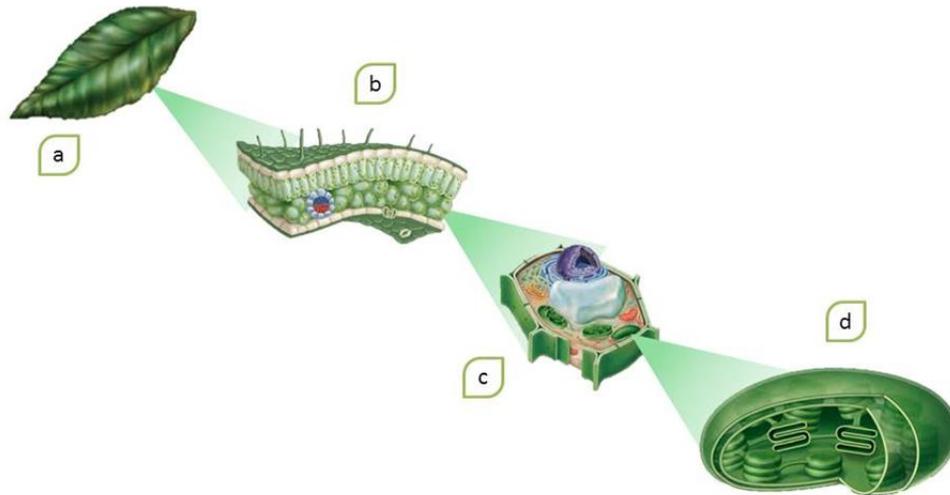


Figura 7.- Localización de los cloroplastos. (a) Hoja, (b) Vista transversal de la hoja, (c) esquema de una célula del mesófilo, (d) Cloroplasto. (Ilustración: Raven *et al.*, 2011)

Internamente los cloroplastos están compuestos por una membrana externa y una membrana interna (tilacoide) acompañada de una sustancia semifluida llamada "estroma". Dicho tilacoide es una bicapa fosfolipídica continua dispuesta en sacos aplanados "*granum*" que se acomodan uno sobre otro formando columnas conocidas como "*grana*", y contiene tanto las moléculas necesarias para capturar la energía lumínica (pigmentos), como a las estructuras necesarias para sintetizar energía en forma de ATP (Fig. 8). El estroma contiene las enzimas requeridas para ensamblar las moléculas orgánicas resultantes del proceso fotosintético (Mader, 2010).

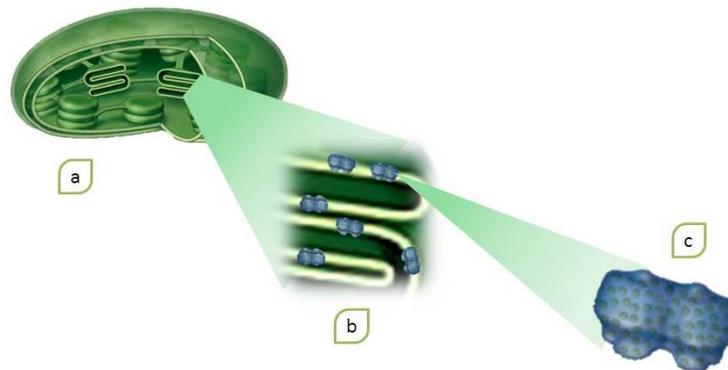


Figura 8.- (a) Esquema de un cloroplasto. (b) Acercamiento a una grana y tilacoide vistas transversalmente. (c) Agrupaciones de clorofilas (Fotosistemas) contenidas en la membrana. (Ilustración: Raven *et al.*, 2011)

## Pigmentos: Clorofila y Carotenoides

Los pigmentos son moléculas capaces de absorber energía lumínica en el espectro visible: de 400 a 700 nm (Curtis *et al.*, 2008; Gracia, 2010; Solarte *et al.*, 2010), siendo aquel color que percibimos en ellos, correspondiente al reflejo de la energía no absorbida (Fig. 9). La absorción ocurre debido a un fenómeno conocido como "efecto fotoeléctrico" que se presenta cuando fotones transfieren energía a electrones que son elevados a niveles energéticos superiores (Raven *et al.*, 2011.). En general, las plantas superiores son portadoras de dos tipos de pigmentos: clorofilas y carotenoides.

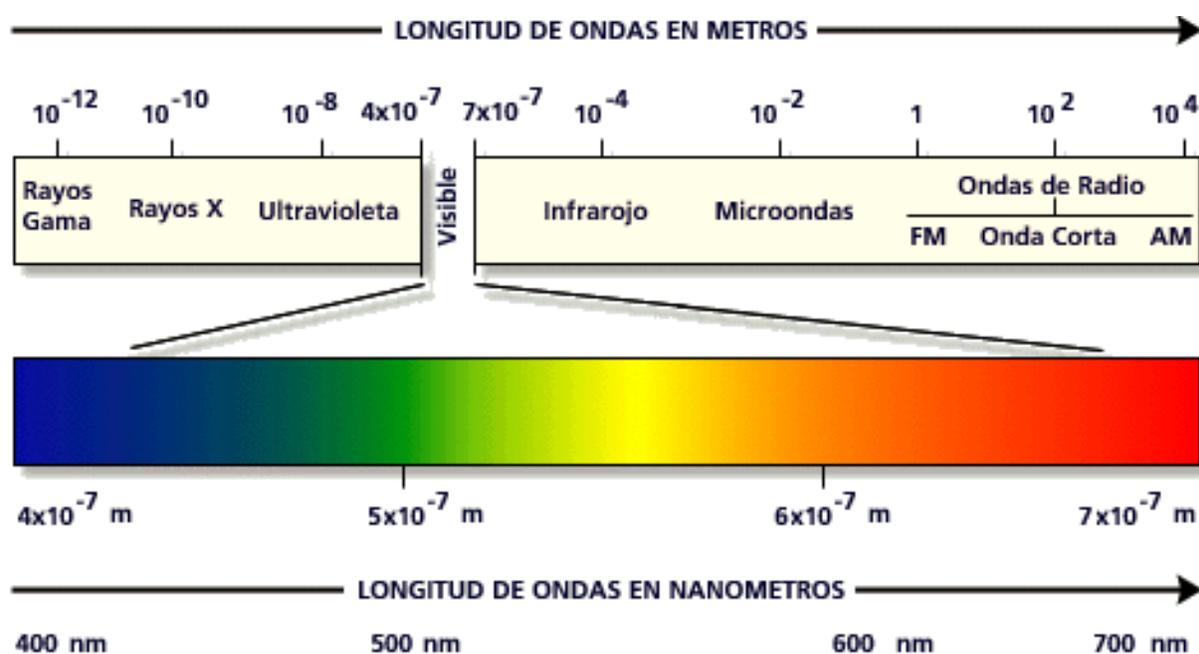


Figura 9.- Ubicación del espectro de luz visible dentro del espectro electromagnético, y longitudes de onda correspondientes a los colores (Ilustración: Zuloaga *et al.*, 1999).

Existen dos tipos de clorofilas en las plantas: *a* y *b*, absorben luz azul-violeta-roja y ninguna de las dos absorbe fotones con longitudes de onda de entre 500 y 600nm por lo que ésta luz es reflejada y percibida por nuestros ojos como color verde. La clorofila *a* es el pigmento principal y único capaz de actuar directamente para convertir energía luminosa en energía química, mientras que la clorofila *b* sirve como pigmento complementario de la clorofila *a* (Curtis *et al.*, 2008.; Raven *et al.*, 2011; Mader, 2010).

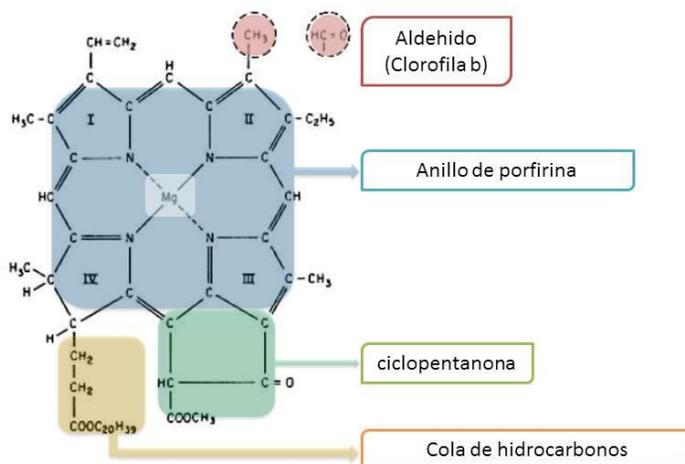


Figura 10.- Estructura química de las clorofilas *a* y *b*. (Ilustración: Martínez, 2013)

Ambos pigmentos contienen una compleja estructura de anillo de carbonos nombrada "Anillo de porfirina" con enlaces simples y dobles, así como un átomo de magnesio al centro, con la única diferencia de que la clorofila *a* presenta un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) y la clorofila *b* un aldehído (-CHO) (Fig. 10). Asociados a las clorofilas están los carotenoides (Strain et al., 1971), conformados por anillos unidos a cadenas de hidrocarburos con enlaces simples y dobles (Fig. 11) y asisten en la captura de energía que no es eficientemente absorbida por las clorofilas. (Raven *et al.*, 2010)

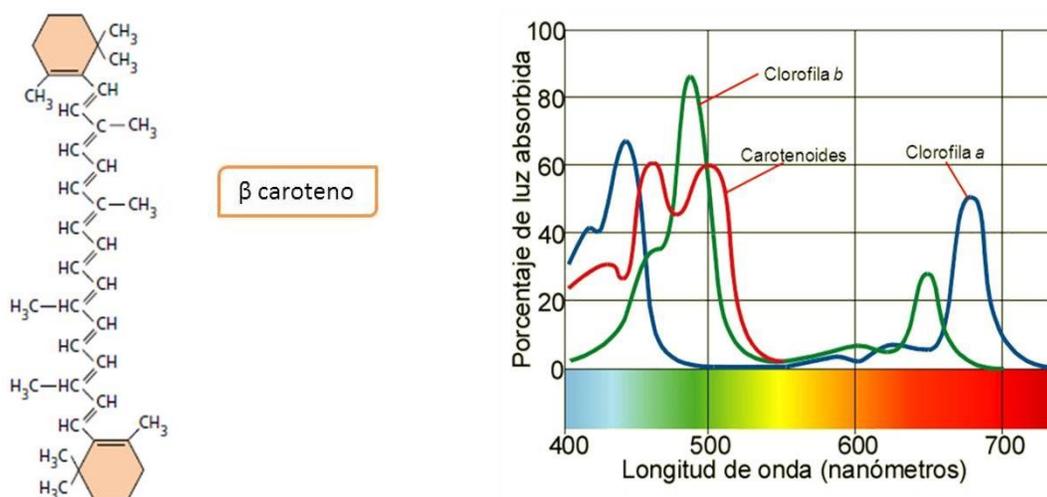


Figura 11.- Estructura química del  $\beta$ -caroteno, carotenoide más abundante de la naturaleza (izquierda) y espectro de absorción de los pigmentos presentes en cloroplastos (derecha) (Ilustraciones: Taiz & Zieger, 2010; Baldonado, 2005).

## Estructuras: Fotosistemas y Complejos acarreadores de electrones

Los pigmentos fotosintéticos, están agrupados y embebidos en el tilacoide en conjuntos conocidos como “fotosistemas” caracterizados por su capacidad para capturar fotones (paquetes de energía luminosa) y actuar como antenas cuando sus componentes elevan su nivel de energía al ser alcanzados por una longitud de onda apropiada de luz. Cada fotosistema está conformado por dos elementos: un “complejo antena” y el “centro de reacción”.

Los complejos antena o “complejos cosechadores de luz” consisten en una red de moléculas de clorofila unidas entre sí y sostenidas firmemente en la membrana tilacoide por una matriz de proteínas y su función es capturar fotones y canalizarlos hacia los centro de reacción, los cuales están constituidos por un complejo transmembranal de proteínas y pigmentos que en este caso son dímeros de clorofila *a* (unión de un par de moléculas de clorofila *a* estructuralmente similares).

Las plantas poseen dos tipos de fotosistemas conectados. Uno de ellos llamado Fotosistema I (PSI), cuenta con un dímero que absorbe energía principalmente a los 700nm de tal forma que su centro de reacción es llamado P700, mientras que el Fotosistema II (PSII) absorbe a los 680nm y su centro de reacción es conocido como P680. (Fig. 12). El orden de operación es del PSII hacia el PSI y poseen potencial suficiente para oxidar el agua y llevar a cabo el transporte electrónico usado para generar ATP y el NADPH necesario para biosintetizar carbohidratos (Gracia, 2010.; Raven *et al.*, 2011.).

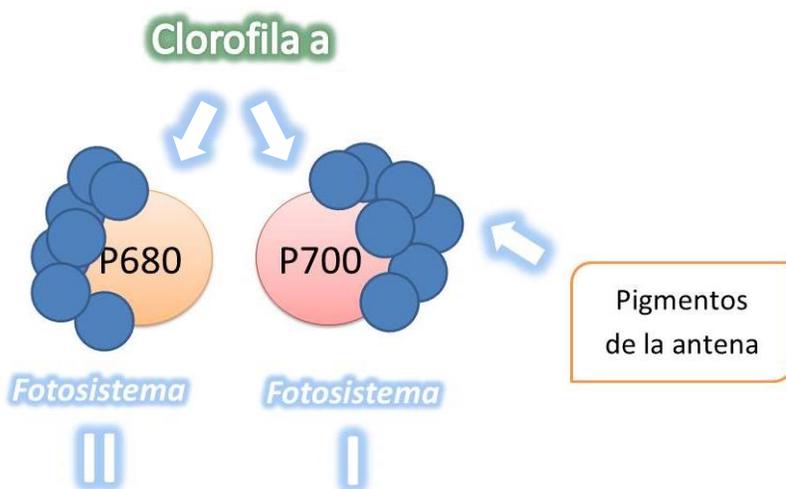


Figura 12.- Centros de reacción y complejos antena de los fotosistemas

Los PSII y PSI se encuentran conectados por un complejo proteínico que sirve como "citocromo/b6-f", se encuentra embebido en la membrana del tilacoide (Fig. 13) y permite bombear protones a través de ella para generar el gradiente de protones empleado por la enzima ATP sintetasa.

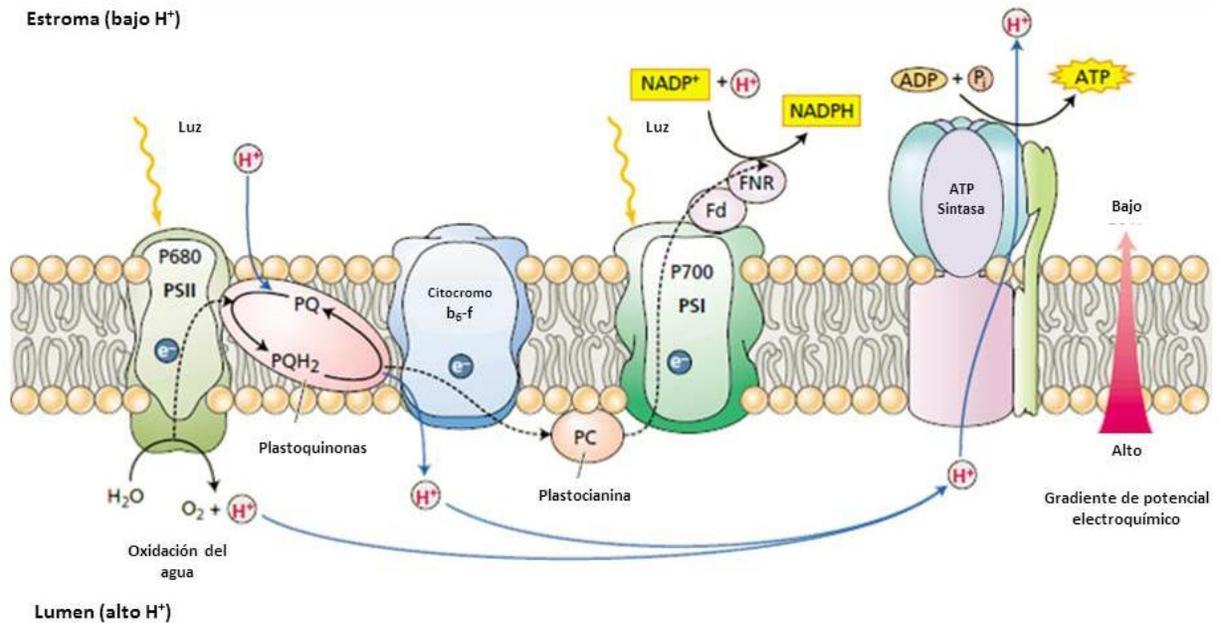


Figura 13.- Fotosistemas y complejos proteínicos embebidos en la membrana del tilacoide en los cloroplastos, a través de los cuales ocurre la captación y transporte electrónico (Ilustración: Taiz & Zieger, 2010).

### Fotoquímica primaria: Absorción de luz y Transporte electrónico

Durante la fotoquímica primaria (también identificada como "eventos primarios" o "fase rápida" debido a la velocidad con que ocurren) el organismo captura energía del sol (Fig. 14), fotones inciden sobre los pigmentos del complejo antena en el fotosistema II (Fig. 15a) y excitan sus electrones (Fig. 15b); dicha energía es transferida al centro de reacción (Fig. 15c) (que cuenta con la presencia de moléculas de Manganeseo y agua unidas a él) en donde excita y transfiere un electrón de una de sus moléculas de clorofila P680 a un aceptor fuera del fotosistema II (Fig. 15d). La P680 recién oxidada remueve un electrón de uno de los átomos de Manganeseo, que en consecuencia remueve electrones de los átomos de Oxígeno oxidando las moléculas de agua hasta producir una molécula de O<sub>2</sub> por

cada dos de agua. Las moléculasceptoras que dan pie al comienzo del transporte electrónico, son una clorofila modificada conocida como feofitina (Pheo) y plastoquinonas:  $Q_A$  y  $Q_B$  (Fig. 15e), las cuales al aceptar un par de electrones se convierten en fuertes donadores de electrones, y transfieren el par excitado a una bomba de protones, el citocromo b6-f (Fig. 15f). Consecuentemente una pequeña proteína contenedora de cobre llamada plastocianina (PC) acarrea el par de electrones hacia el fotosistema I (Fig. 15g).

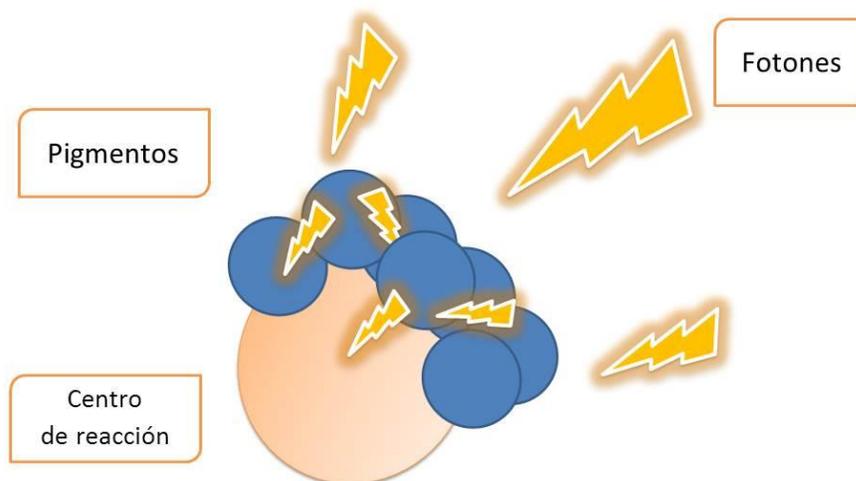


Figura 14.- Fotones de luz solar son captados por el complejo antena en los fotosistemas y la energía es transferida al centro de reacción

El fotosistema I (PSI) acepta un electrón proveniente de la plastocianina (Fig. 15h-m) y continúa con la transferencia energética y la generación del gradiente de protones requerido para sintetizar las moléculas de ATP y NADPH requeridas para brindar energía suficiente en la síntesis de glucosa completando así el proceso fotosintético (Taiz & Zieger, 2010.).

### **Eficiencia fotosintética y su utilización como herramienta de análisis**

En condiciones ideales, las plantas son capaces de utilizar la energía de la luz para impulsar el funcionamiento del proceso fotosintético, sin embargo dicho aprovechamiento nunca es total. Se tiene evidencia de que del 100% de la energía solar, solo un 40% es absorbido por la planta y al final únicamente un 5% es utilizado para la producción de carbohidratos. Lo anterior se debe a que aproximadamente un 16% de la energía se disipa en forma de luz y calor.

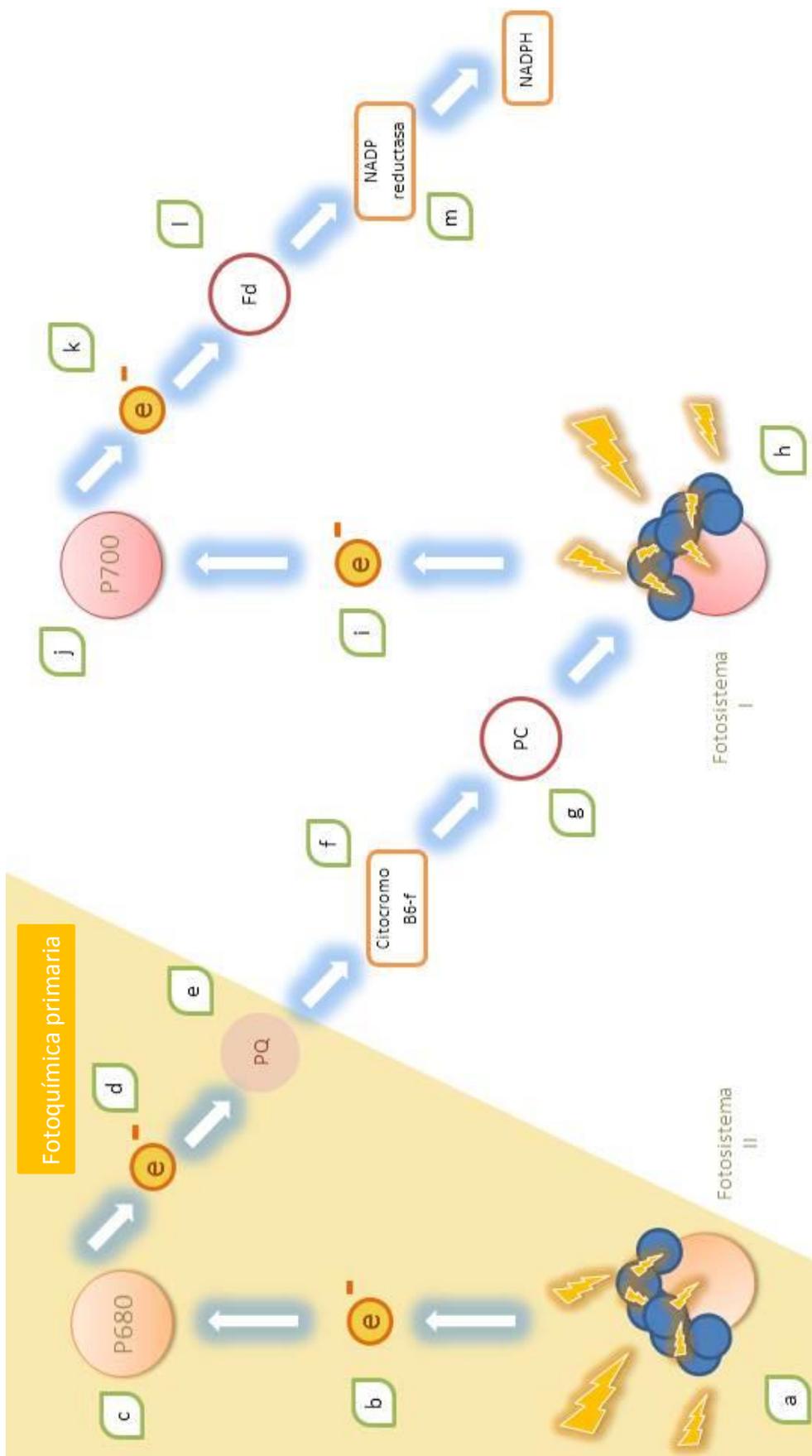


Figura 15.- Esquema general del proceso de transporte electrónico desde la captación de energía luminosa hasta la generación de NADPH (la secuencia del flujo de energía se indica por las letras minúsculas: a – m)

Es así que una molécula de clorofila excitada puede perder energía al re-emitir un fotón para regresar a su estado basal mediante un proceso conocido como fluorescencia (Taiz & Zieger, 2010).

Los cambios en la emisión de fluorescencia pueden utilizarse para revelar mecanismos de respuesta al estrés e identificación de contaminantes y sus fuentes; y existen diversos parámetros y representaciones que permiten expresar la eficiencia fotosintética.

Cuando se ilumina una muestra preconditionada a la oscuridad, la fluorescencia de la clorofila *a* se incrementa rápidamente durante el primer segundo de iluminación; dicho incremento es el reflejo de la reducción (cierre) de los centros de reacción del PSII y provee información de su actividad fotoquímica, así como de la reducción de la plastoquinona y los acarreadores finales del PSI. Este proceso conocido como cinética de fluorescencia o cinética de Kautsky es descrito gráficamente mediante una curva compuesta de cuatro inflexiones nombradas O, J, I, P (Fig. 16). La inflexión O corresponde a la fluorescencia inicial emitida a los 50  $\mu$ s, J a la fluorescencia a los 2 ms, I a los 30 ms y P corresponde a la fluorescencia máxima y que bajo condiciones normales se alcanza en alrededor del primer segundo (Strasser *et al.*, 2000; González *et al.*, 2008).

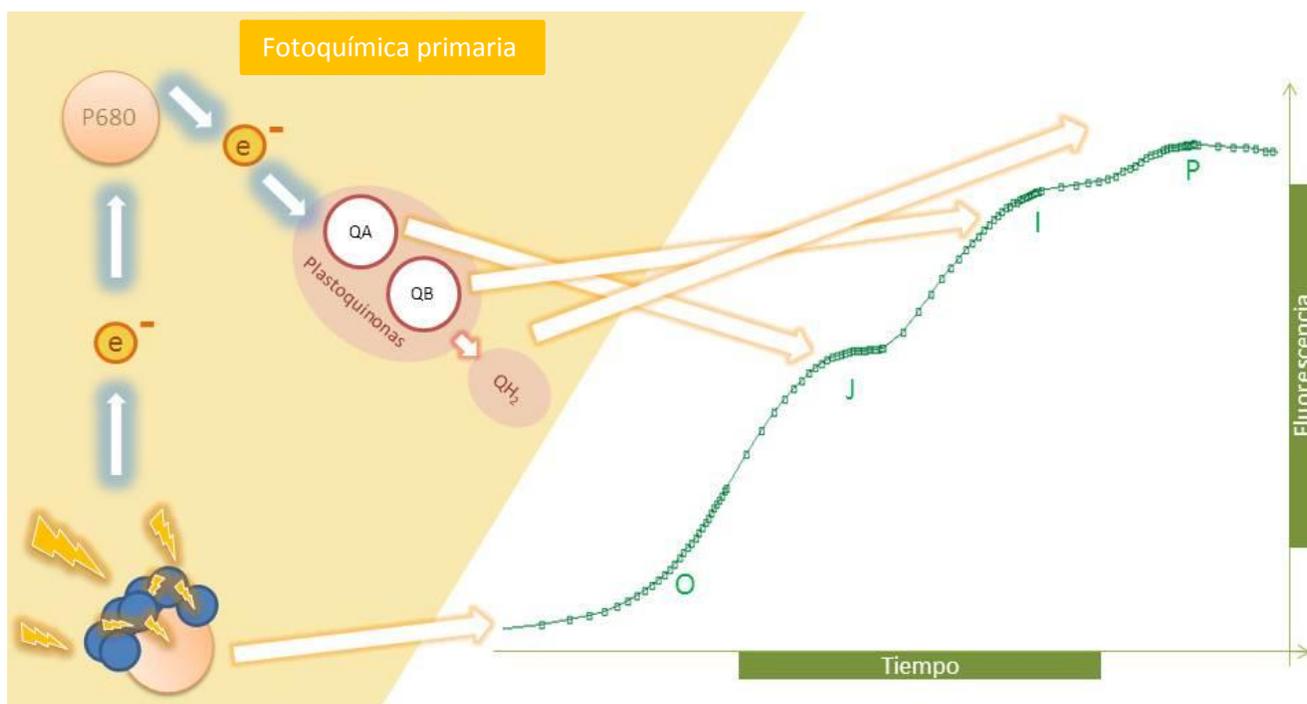


Figura 16.- Cinética de fluorescencia de la clorofila *a* (Derecha) y su correspondencia con los eventos de transporte electrónico durante la fase rápida de la fotosíntesis.

A partir de los valores experimentales de emisión de fluorescencia registrados mediante un fluorómetro, no solamente es posible construir la curva de cinética antes mencionada, también se puede llevar a cabo un análisis completo, conocido como "Prueba JIP" que describe a detalle, aspectos sobre el comportamiento que tiene la transferencia de energía a través del fotosistema II, tal es el caso de la tasa energía absorbida por los pigmentos del complejo antena (ABS), la energía que es transferida del complejo antena al centro de reacción, también conocida como energía atrapada (TR), la cantidad de energía disipada por el centro de reacción (DI), así como la tasa de transferencia de energía del centro de reacción a la cadena transportadora de electrones (ET). Dicho análisis también es útil para hacer inferencias y representaciones esquemáticas sobre eventos tales como cambios de tamaño del complejo antena, activación de los centros de reacción y deducir la eficiencia con que se encuentra trabajando el aparato fotosintético, específicamente el fotosistema II en la presente investigación.

## **ANTECEDENTES**

Okazawa (1962) destaca que la comprensión del mecanismo de formación del tubérculo en *S. tuberosum* no es solamente una cuestión de interés científico desde el punto de vista de la fisiología vegetal, también lo es desde una perspectiva práctica en el campo de la agricultura, y a pesar de las numerosas investigaciones y hallazgos varios detalles al respecto están pendientes a aclararse. A nivel mundial la propagación de papa mediante cultivo *in vitro* se utiliza comúnmente no sólo como herramienta para la producción, también para el estudio de las plantas, tubérculos y sus procesos (Igarza *et al.* 2012).

Investigaciones en busca de la señal inductora de la formación de tubérculos en plantas de papa demuestran que la adición de reguladores de crecimiento como kinetina son efectivos en la estimulación del proceso (Palmer & Smith, 1969). El estudio de Housley & Taylor (1958) sobre composición química del complejo  $\beta$ -inhibidor presente en la piel de papa, registra entre sus componentes la presencia de escopoletina, una cumarina hidroxilada. Poco tiempo después Neuman (1959) destaca que cumarina es por sí misma, un fuerte promotor de la elongación de segmentos vegetales y su efecto no se encuentra confinado a una especie en particular, lo cual sugiere que dicha substancia debe ser considerada como un regulador del crecimiento de origen natural. Tiempo después Paupardin & Tizio (1970) encontraron que diversos derivados fenólicos del ácido cinámico (precursor de las cumarinas) tales como el ácido cafeico, ferúlico, clorogénico y L-cumárico, promueven la tuberización. Posteriormente Stallknecht (1972) y Stallknecht & Farnsworth (1982) demostraron que la adición de cumarina a cultivos *in vitro* de plántulas de *S. tuberosum* en determinadas concentraciones (25–50 mg/L) presenta un efecto positivo sobre la tuberización actuando como inductor del proceso.

Paralelamente Tissut y colaboradores (1980) reportan que algunos flavonoides y derivados del ácido benzoico y cinámico (previamente descritos como promotores de la tuberización) también exhiben un impacto negativo sobre los procesos de fotosíntesis y respiración celular. De igual forma Mersie & Sing (1993) estudiaron los efectos de los ácidos p-cumárico, ferúlico, clorogénico y vanílico

sobre la fotosíntesis de células aisladas de *Abutilon theophrasti* encontrando que presentaron cierta actividad inhibitoria del proceso fotosintético. Macías y colaboradores (1999) también presentaron evidencia de que derivados de cumarina pueden interferir con el metabolismo energético de las plantas a nivel de fotosíntesis al comportarse como inhibidores y/o desacopladores de la transferencia energética. Recientemente la investigación de López (2013), concuerda en que la presencia de cumarina disminuye la capacidad de transferencia energética en el fotosistema II, causa inactivación de centros de reacción e impacta el paso de electrones hacia la cadena transportadora.

Todos estos hallazgos sobre el efecto de la cumarina, precursores y derivados sobre el proceso de tuberización, así como su efecto sobre el transporte electrónico abren la posibilidad para cuestionarse si existe una relación entre la actividad inductora de la tuberización y la actividad inhibitoria del transporte electrónico.

La presente investigación propuso determinar si existe tal relación entre los procesos ya mencionados mediante la realización de cultivos *in vitro* de brotes axilares de *S. tuberosum* en presencia de inductores conocidos y un inhibidor de transporte electrónico comparando sus efectos sobre la tuberización y sobre la actividad del fotosistema II bajo concentraciones limitantes e ideales de sacarosa.

Los inductores seleccionados fueron kinetina y cumarina, mientras que el compuesto inhibidor elegido fue el herbicida DCMU: diclorofenil-dimetilurea (comercialmente conocido como diuron) por poseer un mecanismo de acción basado en la interrupción del transporte electrónico durante la fase rápida de la fotosíntesis (Taiz & Sieger, 2010), mecanismo semejante al reportado para cumarina. La presencia de sacarosa en concentraciones limitantes (3%) e ideales (6%) tiene como objeto poder asegurar que los resultados no estuvieron condicionados a dicho factor y que efectivamente fueron causados por cumarina, kinetina y diuron.

## **HIPÓTESIS**

Si cumarina presenta actividad inductora sobre el proceso de tuberización en *S. tuberosum*, y evidencia señala que cumarina inhibe el transporte electrónico en el fotosistema II, entonces la interrupción del transporte electrónico fotosintético mediante otro inhibidor podrá inducir el proceso de tuberización.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Evaluar si la inhibición del transporte electrónico en fotosíntesis es requerida para inducir la formación de tubérculos en plantas de *S. tuberosum*.

### **Objetivos particulares:**

- Cultivar brotes axilares y aplicarles los tratamientos: dos inductores de tuberización conocidos (kinetina y cumarina) y un inhibidor del transporte electrónico (diuron) en dos medio de cultivo diferentes (sacarosa 3% y sacarosa 6%)
- Registrar características del desarrollo vegetativo y tuberización: sobrevivencia, altura, porcentaje de tuberización y peso de los tubérculos
- Cuantificar pigmentos fotosintéticos: clorofila *a*, *b* y carotenoides totales
- Determinar el estado del funcionamiento del transporte electrónico mediante la medición de la cinética de emisión de fluorescencia del fotosistema II de clorofila *a* y el cálculo de los flujos de energía específicos, fenomenológicos y rendimientos cuánticos.
- Establecer la relación entre el funcionamiento del transporte electrónico en el fotosistema II durante la fotosíntesis y la formación de tubérculos.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Plantas de papa**

Plantas de *S. tuberosum* var. alpha fueron obtenidas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en la Unidad de Morfofisiología de la FES – Iztacala, las cuales se propagaron mediante cultivos *in vitro* en medio de crecimiento de acuerdo al Centro Internacional de la Papa: CIP (Tovar *et al.*, 1985).

### **Unidad experimental**

De los cultivos anteriormente mencionados se obtuvieron los 160 explantes requeridos para la aplicación de tratamientos. Tales explantes consistieron en segmentos de tallo con entre 2 y 3 brotes axilares, los cuales fueron sembrados individualmente en tubos de ensayo con aproximadamente 20 mL de medio de cultivo más el tratamiento correspondiente. Los tubos fueron sellados con una película plástica de PVC.

### **Medio de cultivo y aplicación de tratamientos**

Para probar todos los tratamientos en dos concentraciones de sacarosa se preparó medio de cultivo con 3% de sacarosa (medio C, ver anexo) y medio de cultivo con 6% de sacarosa (medio S) repartiendo 80 explantes en cada tipo de medio. De los cuales, 10 unidades permanecieron como grupo control (sin adición de tratamiento); 30 unidades fueron adicionadas con cumarina (1,2-benzopirona) y otras 30 unidades con diuron (DCMU: diclorofenil-dimetilurea), Dado que cumarina y diuron fueron aplicados a tres concentraciones diferentes: baja (102.66  $\mu\text{M}$ ), media (171.11  $\mu\text{M}$ ) y alta (342.23  $\mu\text{M}$ ), a cada concentración correspondieron 10 unidades; Por último, las 10 unidades restantes fueron adicionadas con Kinetina en concentración única de 16  $\mu\text{M}$  (Palmer & Smith, 1969) para servir como referentes de la inducción de tuberización.

Al final, los tratamientos quedaron conformados por: control, kinetina, cumarina 102.66  $\mu\text{M}$  (denominado C1 en gráficas), cumarina 171.11  $\mu\text{M}$  (C2), cumarina 342.23  $\mu\text{M}$  (C3), diuron 102.66  $\mu\text{M}$  (D1), diuron 171.11  $\mu\text{M}$  (D2) y diuron 342.23  $\mu\text{M}$  (D3), cada uno en presencia de sacarosa al 3 y 6%;

sumando en total 16 tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Los cultivos fueron colocados a una temperatura aproximada de 23°C, bajo luz fluorescente y fotoperiodo corto (8 h) durante 30 días.

### **Determinación de las características de tuberización y desarrollo vegetativo**

Una vez transcurridos 30 días de crecimiento se registró la frecuencia de tuberización por tratamiento, cantidad de tubérculos por unidad y el peso fresco por tubérculo, para lo cual se extrajeron del cultivo y pesaron individualmente con balanza analítica. Se registró la frecuencia de sobrevivencia por tratamiento, se observaron y registraron fotográficamente las características morfológicas de las plántulas y se midió la altura de cada vástago mediante vernier. El análisis estadístico aplicado para determinar la presencia de diferencias mínimas significativas en las frecuencias de sobrevivencia y tuberización fue la prueba exacta de Fisher ( $P < 0.001$ ), mientras que para la cantidad de tubérculos, peso fresco y altura se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis ( $P < 0.001$ ) con los métodos de Dunn y Tukey ( $P < 0.05$ ) para determinar diferencias entre tratamientos.

### **Cuantificación de pigmentos**

Debido a la cantidad de tejido disponible, la cuantificación del contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales por gramo de tejido fresco se llevó a cabo por tratamiento. (Lichtenthaler & Buschmann, 2001, ver anexo).

### **Determinación de fluorescencia, flujos de energía y rendimientos cuánticos**

Por último, en dos unidades por cada tratamiento (debido a la disponibilidad de hojas con el tamaño requerido para el análisis) se determinó la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* en hojas pre-acondicionadas a la oscuridad por 10 minutos mediante un fluorómetro de excitación continua (Plant Efficiency Analyzer: PEA, de Hansatech Instruments Ltd) aplicando un pulso de luz roja ultra-brillante con pico de 650 nm a una intensidad de  $3,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 1 segundo y con ayuda de programas informáticos<sup>1</sup> se aplicó la prueba JIP a los datos obtenidos para conocer el

---

<sup>1</sup> Analyser v.2.04 (1992) y PEA Plus v.1.02 (2007) de Hansatech Instruments, Microsoft Excel (2010) de Microsoft Corporation y Biolyzer v.4.0.30.03.02 (2002) del laboratorio de bioenergéticos de la Universidad de Ginebra.

comportamiento y eficiencia de los flujos de energía bajo condiciones inductoras y no inductoras de la tuberización

## RESULTADOS

### Tuberización

El medio con sacarosa 6% acumuló el mayor porcentaje de tuberización (60%). Por otra parte, en los cultivos con sacarosa 3%, el grupo control no presentó tubérculo alguno, mientras que el grupo creciendo en medio con kinetina lo rebasó significativamente con 80% de tuberización (Fig. 17). Mientras tanto, la exposición con cumarina indujo desde un 30% de tuberización a concentración baja, e incrementó significativamente a 90% cuando se aplicó a concentración media, llegando al 100% de individuos con al menos un tubérculo cuando los cultivos crecieron en presencia de la concentración alta. En general, el porcentaje de tuberización de todos los grupos con cumarina fue de 73% (significativamente mayor al control).

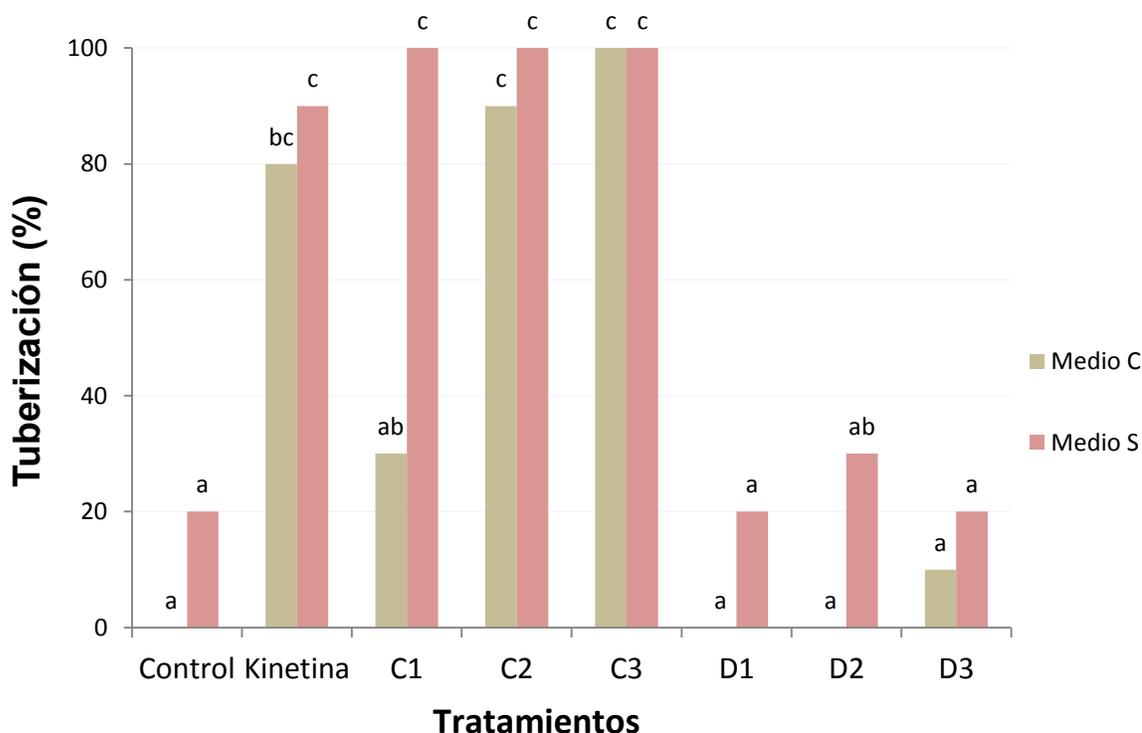


Figura 17.- Porcentaje de tuberización en *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos (Letras distintas = diferencia significativa entre tratamientos  $P < 0.001$ )

En el caso de diuron, los tratamientos con las concentraciones 102.6  $\mu\text{M}$  y 171.1  $\mu\text{M}$  no mostraron tubérculo alguno y a concentración elevada (342.2  $\mu\text{M}$ ) únicamente tuberizó el 10% de las

plantas (estadísticamente no significativo); por este motivo el porcentaje general de tuberización con diuron fue únicamente del 3.3%, de tal modo que estadísticamente cumarina tuvo actividad inductora superior a la observada con diuron.

El medio S exhibió en el grupo control un 20% de plantas tuberizadas (sin diferencia significativa respecto al control de sacarosa 3%), mientras que aquel grupo tratado con kinetina si tuberizó significativamente (90%). Los tres grupos con cumarina tuberizaron completamente, mientras que diuron no mostró más allá del 30% de formación de tubérculos a concentración media y 20% a concentraciones de 102.6 y 342.2  $\mu\text{M}$ ; de nuevo esto implica que la tuberización registrada con diuron, a pesar de contar con mayor disponibilidad de sacarosa en los cultivos no fue superior a la registrada con kinetina o cumarina. No hubo diferencia significativa entre medios de cultivos.

### ***Peso fresco y cantidad***

Dentro del medio C, el peso promedio de los tubérculos producidos por las plantas tratadas con kinetina fue de 43.5 mg. Para los tubérculos inducidos con cumarina 102.6  $\mu\text{M}$  la media de peso fue de 90 mg, a concentración 171.1  $\mu\text{M}$  el peso registrado fue de 37 mg, y a concentración alta el peso de 75 mg; estadísticamente no hay diferencias significativas respecto a kinetina. El único tubérculo entre los grupos con diuron (342.2  $\mu\text{M}$ ) registró un peso de 8.5 mg.

Por su parte, en el medio S, los tubérculos del grupo control pesaron en promedio 74 mg y en presencia de kinetina 25 mg. Con cumarina las medias incrementaron de 55 mg hasta 115 mg conforme incrementó la concentración del tratamiento y estadísticamente no hay diferencia significativa entre kinetina y cumarina. Los promedios con diuron oscilaron entre los 30 y 21 mg, no obstante ninguna concentración representó una diferencia estadísticamente significativa respecto al control con 6% de sacarosa, ni una hubo semejanza con aquellos surgidos en presencia de kinetina o cumarina.

Cabe resaltar que de entre todos los tratamientos y ambos medios, con una media de peso de 115.18 mg, el grupo de cumarina 342.2  $\mu\text{M}$  en sacarosa 6% (medio S) provocó la formación de los

tubérculos más grandes (Fig. 18), los cuales fueron al menos 2.6 veces más pesados que los originados con kinetina (en medio C).

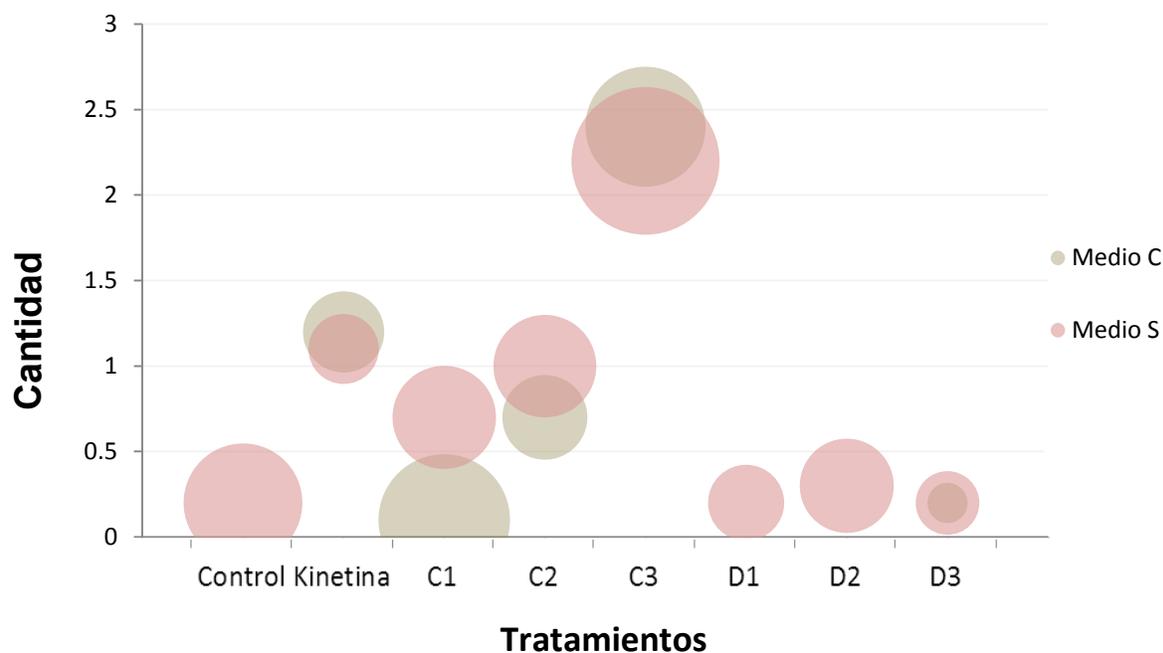


Figura 18.- Cantidad y peso promedio de los tubérculos producidos en *S. tuberosum* según los diferentes tratamientos (el tamaño de las burbujas es proporcional al peso).

Acerca de la cantidad de tubérculos producidos, en el medio S resultó aproximadamente 12% mayor que en medio de crecimiento. El grupo control en sacarosa abundante generó en promedio menos de 1 tubérculo por planta y el grupo con kinetina 1 tubérculo, cantidad superada por cumarina solamente hasta que ésta fue aplicada en concentración alta (342.2  $\mu\text{M}$ ) generando en promedio más de dos tubérculos por planta (estadísticamente la concentración que produjo mayor número de tubérculos por planta en ambos medios). Los tratamientos con diuron sin importar la concentración indujeron cantidades similares a los controles.

## Desarrollo vegetativo

### *Sobrevivencia*

Las observaciones indican que con un 98.75% de sobrevivencia en total, ninguno de los tratamientos implicó una reducción significativa en el número de individuos vivos a los 30 días.

### Altura

En promedio, las plantas de *S. tuberosum* que se desarrollaron en medio C (con sacarosa 3%) tuvieron una altura mayor (28 mm) que aquellas creciendo en medio S (14 mm).

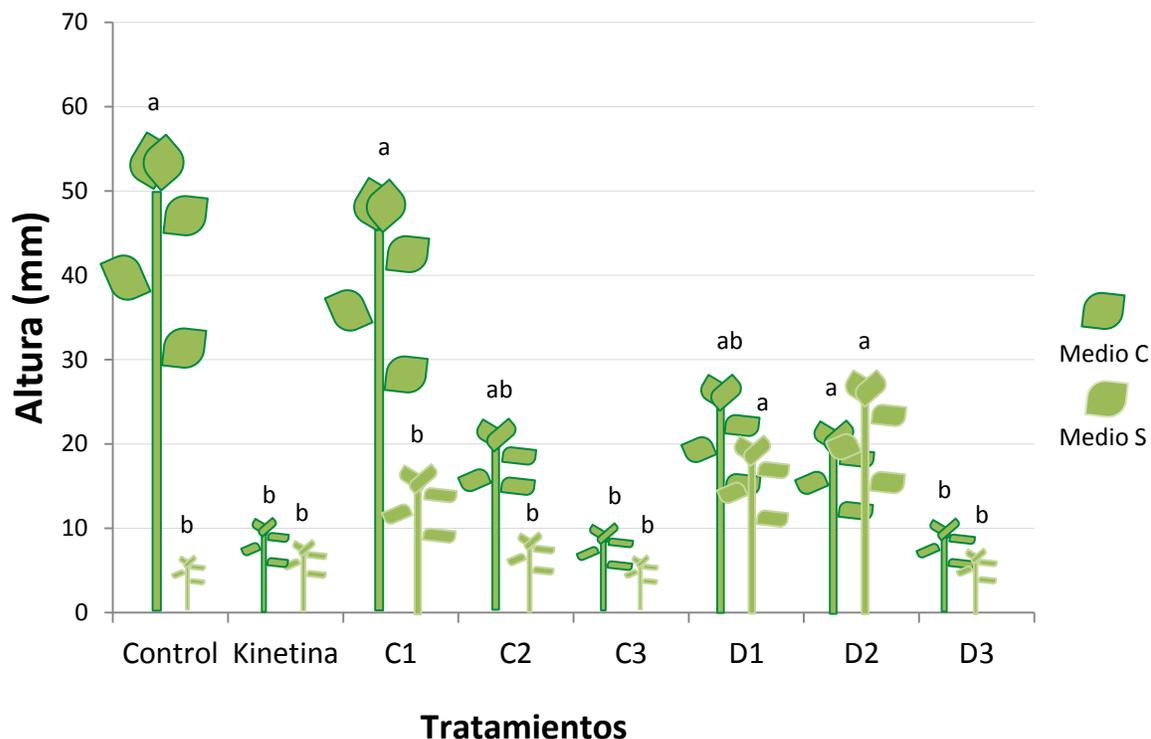


Figura 19.- Promedio de altura de *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos (Letras distintas = diferencia significativa entre tratamientos  $P < 0.001$ )

Dentro del medio C, la media de altura registrada por el grupo control fue 57 mm, lo cual le ubicó como el grupo más alto entre todos los tratamientos (Fig. 19), específicamente registro un máximo de altura de 108 mm y un mínimo de 16 mm. Aquellos cultivos creciendo en presencia de kinetina fueron 81% más pequeñas (estadísticamente significativo). Respecto a cumarina y diuron, ambos tratamientos dieron pie a cultivos más pequeños conforme al incremento en su concentración, reduciendo su tamaño hasta un 81 y 80% respectivamente cuando se aplicaron a 342.2  $\mu\text{M}$ . Lo anterior indica que cumarina y diuron afectaron en proporción similar a kinetina el crecimiento de *S. tuberosum* hasta que se aplicaron a la máxima concentración. El medio S se caracterizó por contar con el mayor número de grupos significativamente más pequeños, donde incluso el grupo control con 6% de sacarosa tuvo un crecimiento 87% menor en comparación al control en el medio con 3% de sacarosa.

El incremento en la concentración de sacarosa proporcionada por el medio S al tratamiento con kinetina originó plantas con menor altura (8.69mm) en comparación con el mismo tratamiento en medio C. En el caso de cumarina, provocó el desarrollo de plantas significativamente más pequeñas a partir de concentraciones menores de cumarina (102.6  $\mu\text{M}$ ) con una altura media de 17.9mm hasta una media de 7.2 mm con 342.2  $\mu\text{M}$ . Inesperadamente, las plantas creciendo con diuron en concentraciones de 102.6  $\mu\text{M}$  y 171.1  $\mu\text{M}$  alcanzaron alturas mayores (21.7 y 29 mm respectivamente) que aquellas en presencia de cumarina a las mismas concentraciones, sin embargo al aplicar la máxima concentración de diuron, el nivel de inhibición fue semejante al inducido por cumarina a la misma concentración y semejante al nivel de inhibición de kinetina (altura 86% menor respecto al grupo control con sacarosa 3%). Los tratamientos con diuron contaron además con el mayor número de brotes laterales de todos los cultivos.

### ***Desarrollo vegetativo (características morfológicas)***

Los cultivos con sacarosa al 3% (Fig. 20) se caracterizaron por desarrollar brotes vigorosos y pubescentes, en promedio de 57 mm, con hojas grandes, expandidas, coloración saludable y con un desarrollo radicular óptimo; en cambio un incremento a 6% de sacarosa dio paso a brotes delgados y significativamente pequeños, encorvados, de coloración ligeramente pálida y hojas pequeñas delgadas, con sistema radicular presente y engrosamientos puntuales en el vástago que no llegan a formar tubérculos bien definidos (Fig. 24). Aquellas plantas que sí logran formar tubérculos definidos en sacarosa 6% muestran una coloración café-amarilla.

La aplicación de kinetina indujo el desarrollo de brotes significativamente pequeños y delgados (Fig. 21a y 24b), también con algunos engrosamientos puntuales, coloración pálida, presencia de hojas reducidas y con áreas necrosadas, además de originar ensanchamiento en la base del explante y un sistema radicular prácticamente ausente. Sus tubérculos exhiben coloración café-rojiza.

Sobre el efecto de cumarina en el desarrollo, resalta que ésta redujo gradualmente el crecimiento de los brotes de *S. tuberosum* a medida que incrementa su concentración (Fig. 21b,c y 22), lo mismo ocurrió con las raíces, así como con el tamaño y presencia de hojas en las cuales llegó a

inducir la presencia de coloración rojiza, observándose un impacto significativo a concentración de 342.2  $\mu\text{M}$ . El efecto de cumarina se hizo más evidente a concentraciones menores en combinación con sacarosa abundante (Fig. 25). Particularmente, la concentración 102.6  $\mu\text{M}$  indujo el crecimiento de brotes engrosados, altamente erguidos y con un sistema radicular prolifero. Los tubérculos inducidos por cumarina presentan una coloración que va del café claro a completamente pálida.

El herbicida diuron, a pesar de reducir gradualmente la altura de las plántulas conforme incrementa la concentración, generar una presencia importante de lenticelas y un sistema radicular reducido, también produjo brotes con la particularidad de estar altamente ramificados y con crecimiento diageotrópico, es decir, inclinado hacia el medio de cultivo, (Fig. 23 y 26). Dichos cultivos contaron además con una mayor cantidad de hojas las cuales presentaron tamaño mixto, y con la presencia de engrosamientos en ciertas zonas del vástago que se generalizaron a toda la plántula ante la aplicación de concentraciones mayores del inhibidor, pero sin llegar a formar tubérculos definidos en la mayoría de los casos.

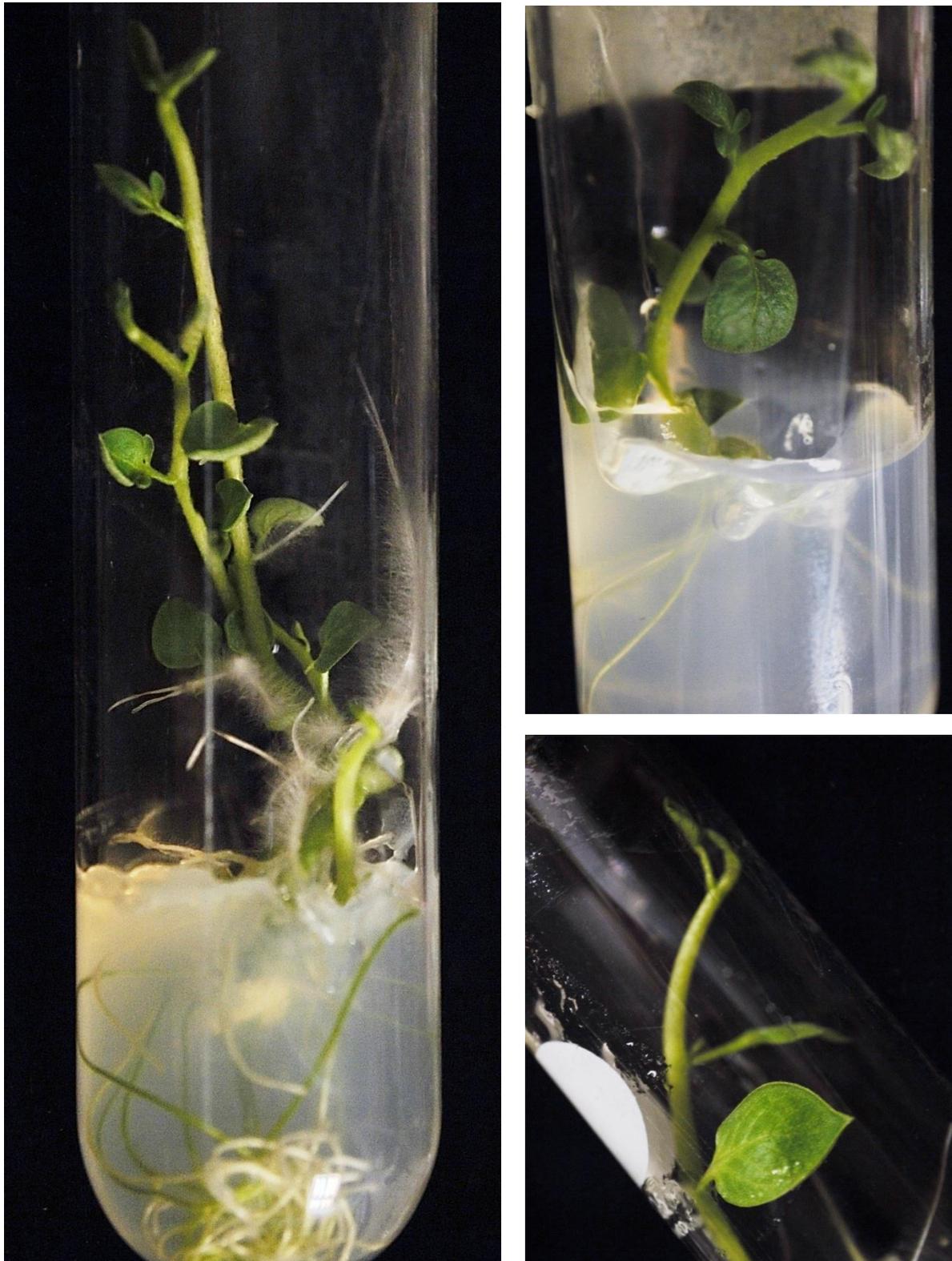


Figura 20.- Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo *in vitro* con 3% de sacarosa (Control) a los 30 días de crecimiento

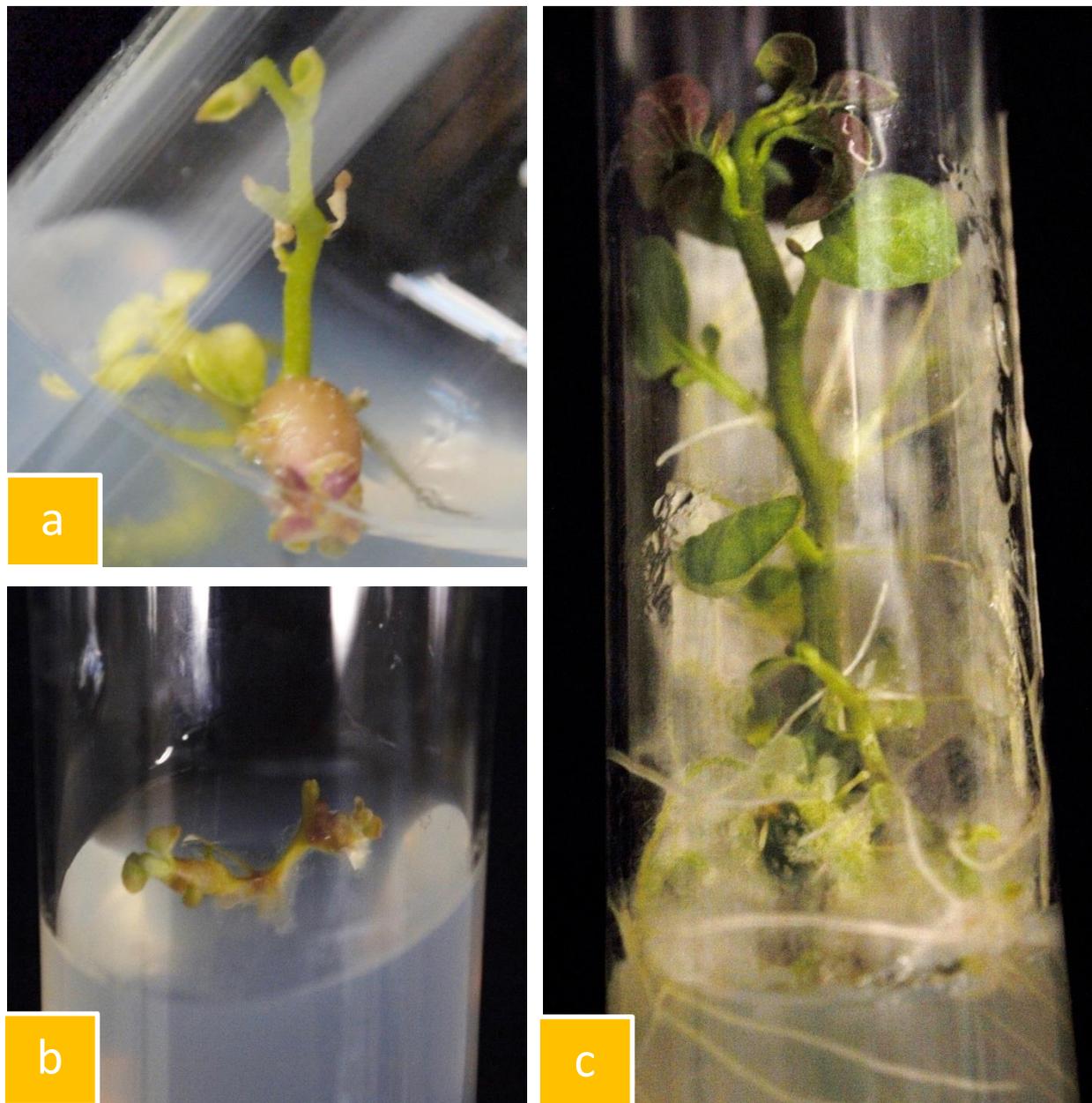


Figura 21.- Plántulas de *S. tuberosum* a los 30 días de crecimiento en cultivo *in vitro* con 3% de sacarosa más tratamientos:

- (a) kinetina: plántula con tubérculo originado a partir de una yema axilar
- (b) cumarina 102.6  $\mu\text{M}$ : brote engrosado, altamente enraizado y con la presencia de hojas apicales enrojecidas
- (c) cumarina 171.1  $\mu\text{M}$ : brote con engrosamientos puntuales característicos de la etapa previa a la aparición de tubérculos visibles

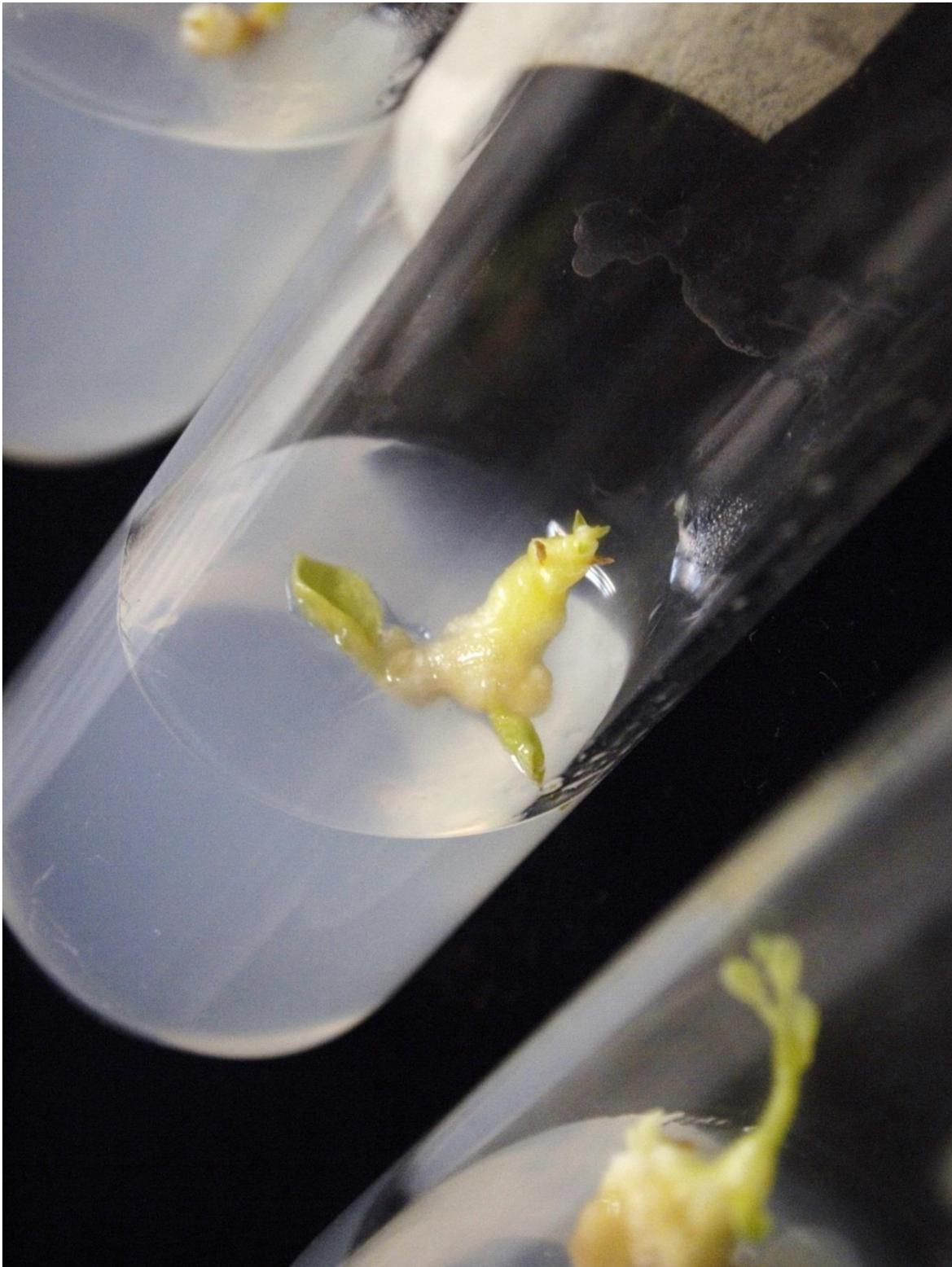


Figura 22.- Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo *in vitro* con 3% de sacarosa y cumarina a concentración alta (342.2  $\mu\text{M}$ ). La inducción de formación de tubérculos es tan alta que el brote se vuelve una agrupación de tubérculos donde resulta difícil distinguirlos de manera individual.

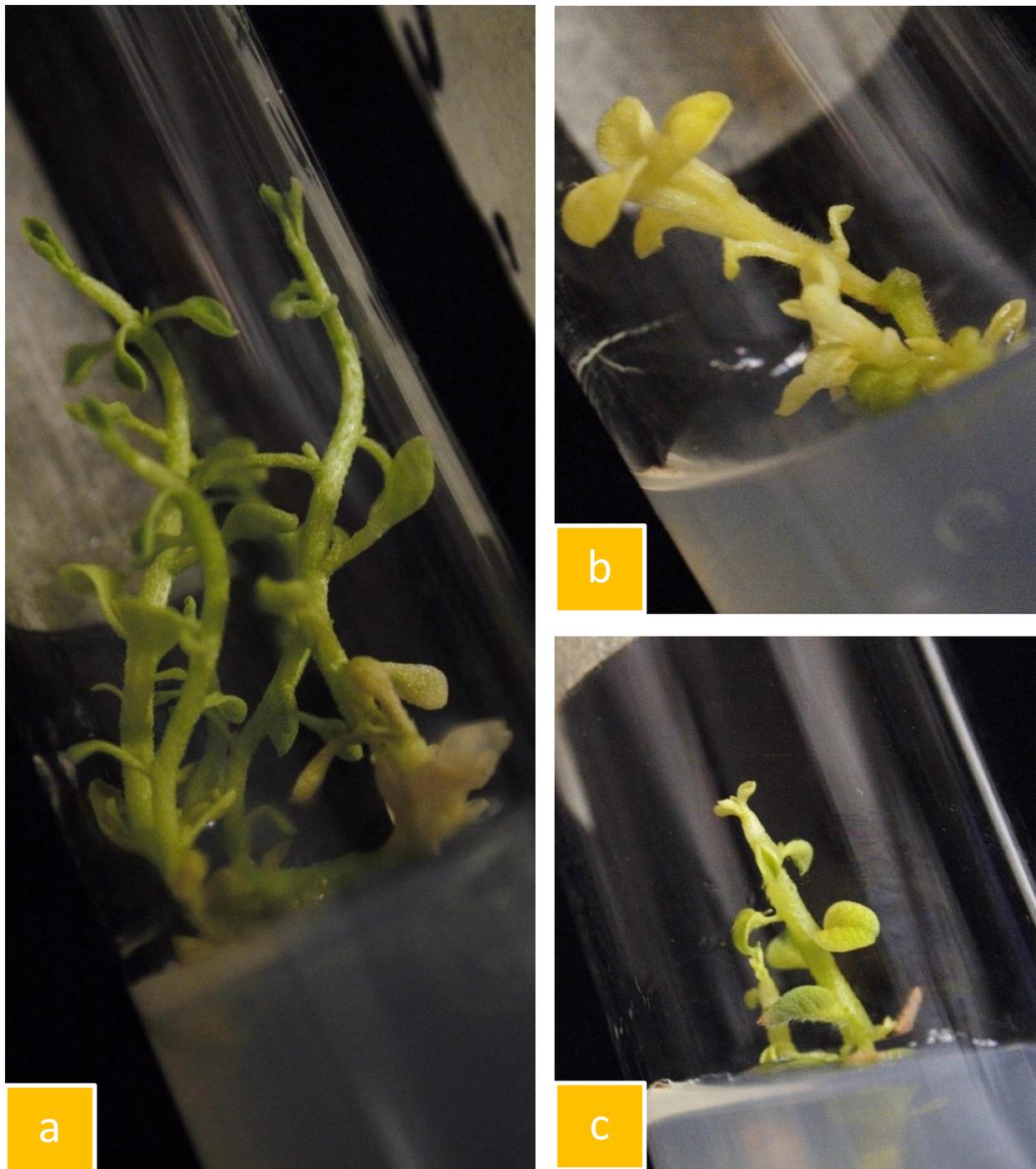


Figura 23.- Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo *in vitro* con 3% de sacarosa y diuron:

(a) 102.6  $\mu\text{M}$ : brotes altamente ramificados con crecimiento diageotrópico y engrosamiento

(b) 171.1  $\mu\text{M}$  y (c) 342.2  $\mu\text{M}$ : brotes poco desarrollados y engrosados

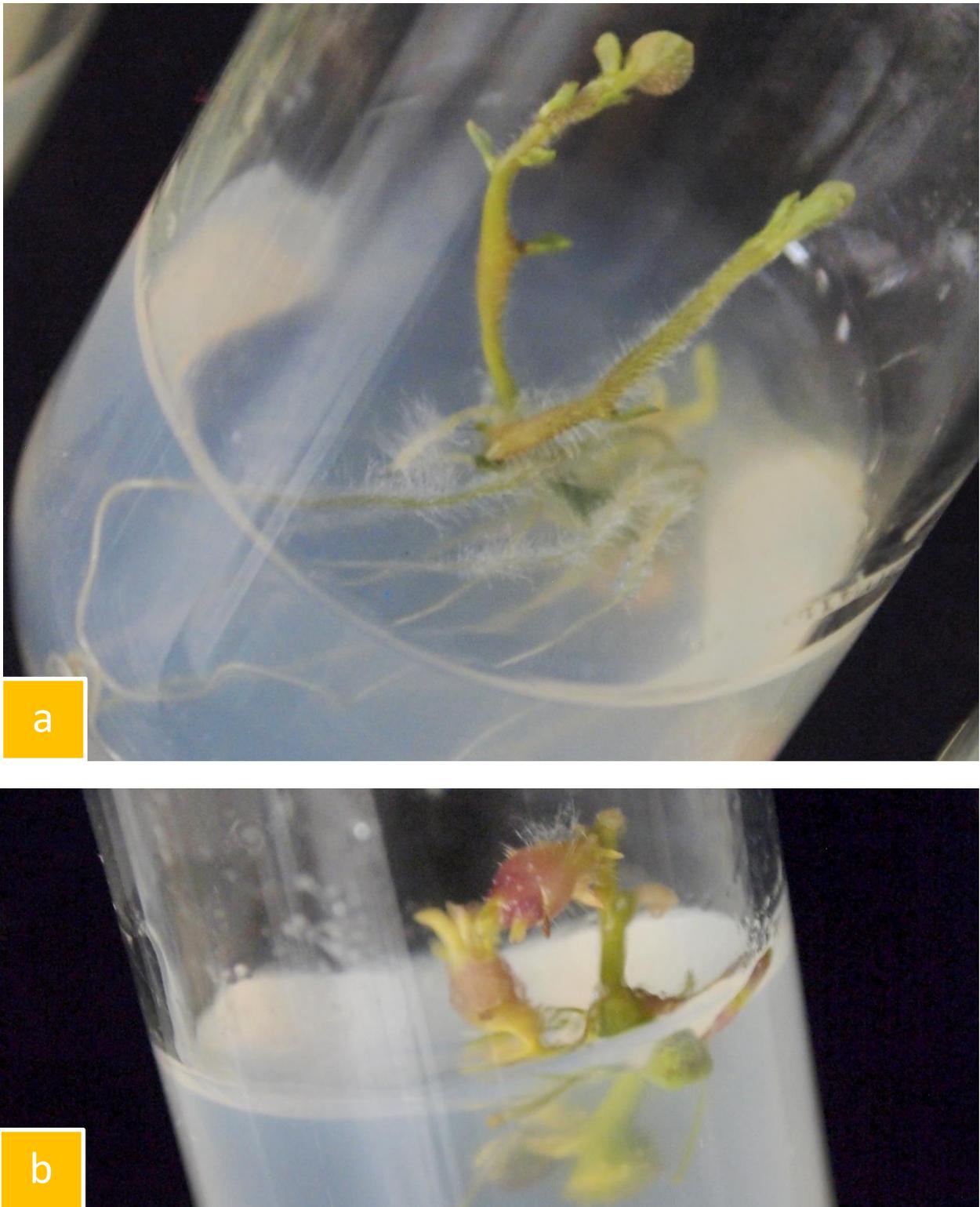


Figura 24.- Plántulas de *S. tuberosum* en cultivo *in vitro* con 6% de sacarosa.

- (a) Control: brotes poco desarrollados y engrosamientos puntuales
- (b) kinetina: brotes axilares tuberizados

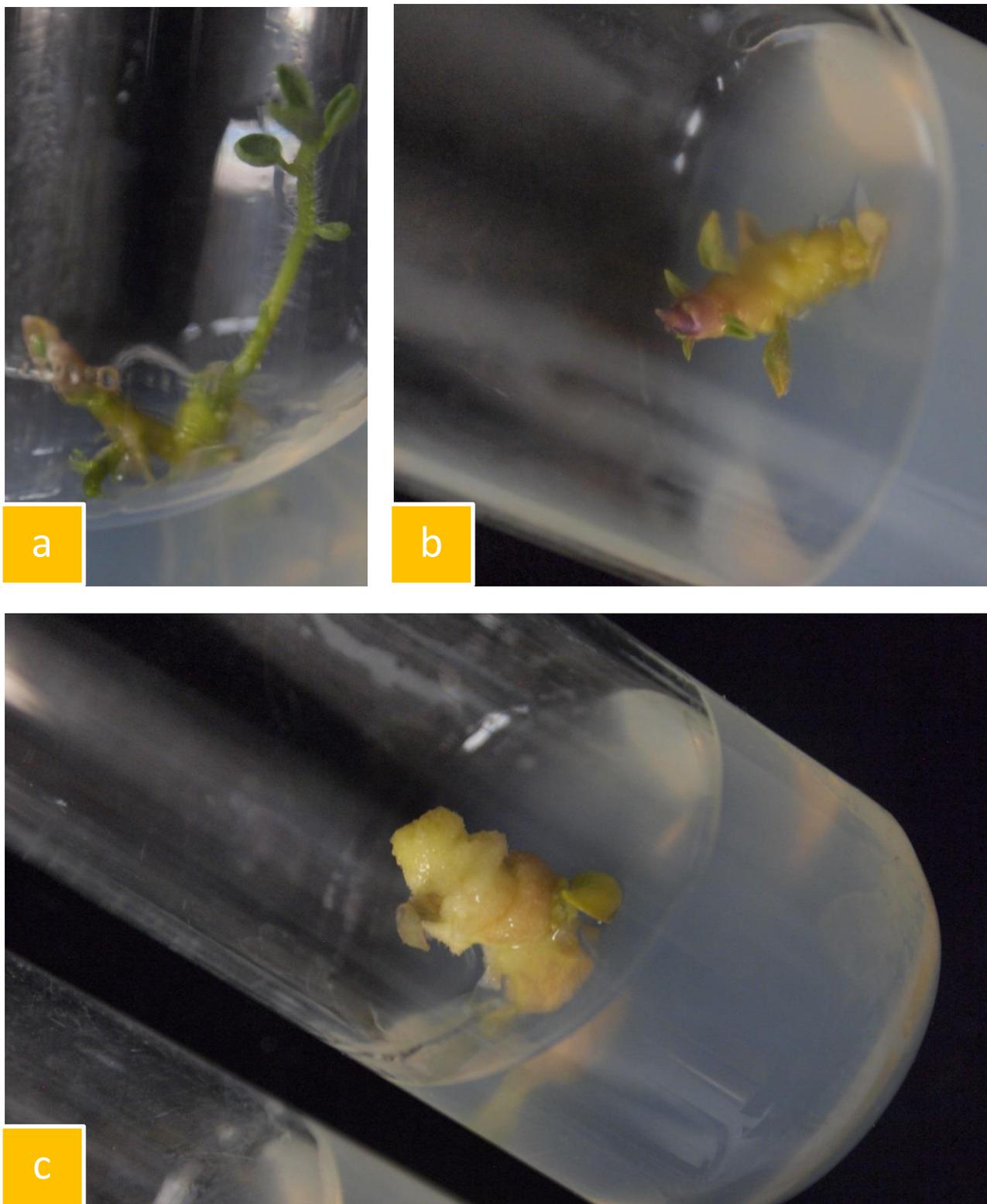


Figura 25.- Plántula de *S. tuberosum* en cultivo *in vitro* con 6% de sacarosa y cumarina.

- (a) 102.6  $\mu\text{M}$ : poco desarrollo vegetativo y presencia de engrosamientos y tubérculos  
(b) 171.1  $\mu\text{M}$  y (c) 342.2  $\mu\text{M}$ : desarrollo vegetativo inhibido con una fuerte inducción de tubérculos



Figura 26.- Plántula de *S. tuberosum* en cultivo *in vitro* con 6% de sacarosa y diuron.

- (a) 102.6  $\mu\text{M}$ : brote altamente ramificado con crecimiento diageotrópico y engrosamiento  
(b) 171.1  $\mu\text{M}$  y (c) 342.2  $\mu\text{M}$ : brotes poco desarrollados y altamente engrosados

## Pigmentos

### Clorofilas

En su mayoría, el decremento en la cantidad de pigmentos fue inversamente proporcional al incremento de concentración en los tratamientos. La concentración de clorofilas *a*, *b* y carotenoides en los controles fue superior a todas las registradas por los tratamientos con kinetina, cumarina y diuron, excepto por cumarina en concentración 102.6  $\mu\text{M}$  que indujo una cantidad de pigmentos casi tres veces superior a la obtenido por los grupos control con 3 y 6% de sacarosa (Fig. 27). La disminución de clorofila *a* en plantas tratadas con cumarina y diuron a concentraciones de 171 y 342  $\mu\text{M}$  resultó similar a la inducida por kinetina (hasta 89%). Por sí misma, la presencia de sacarosa 6% originó un declinó de clorofila *b* en 33%, mientras que kinetina lo hizo en 70% (efecto que se acentuó en combinación con sacarosa 6%). Cabe resaltar que la presencia de diuron provocó un ligero incremento sobre la concentración de clorofila *b* cuando el nivel de sacarosa fue de 3%.

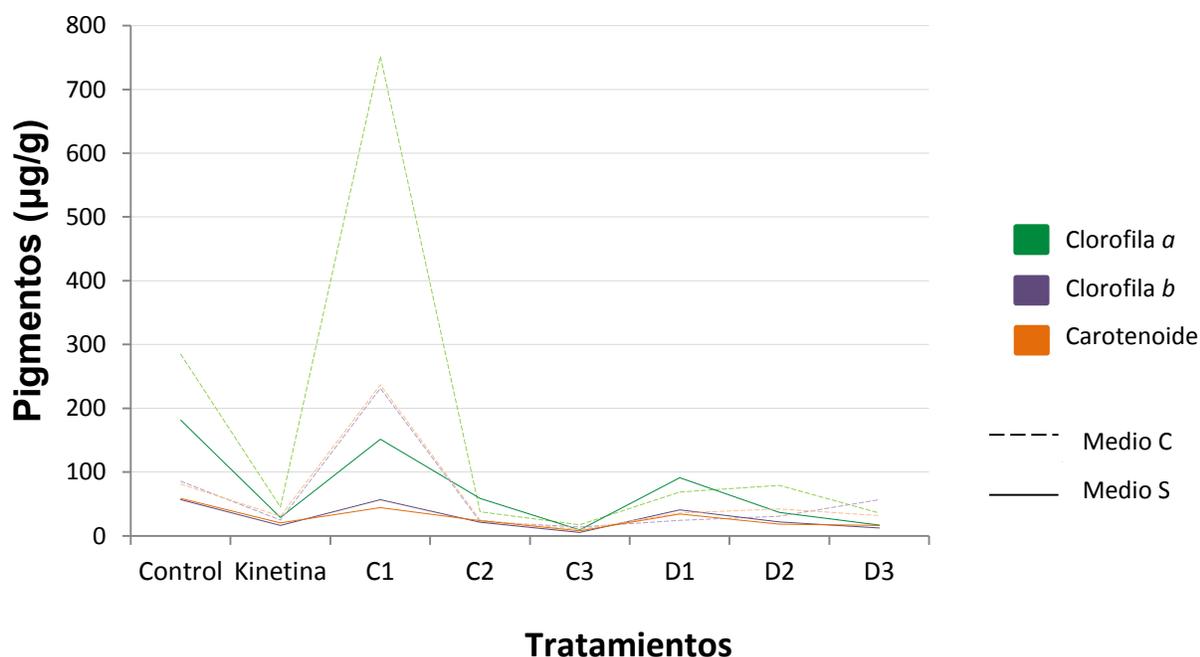


Figura 27.- Concentración de Clorofila *a*, *b* y carotenoides en *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos

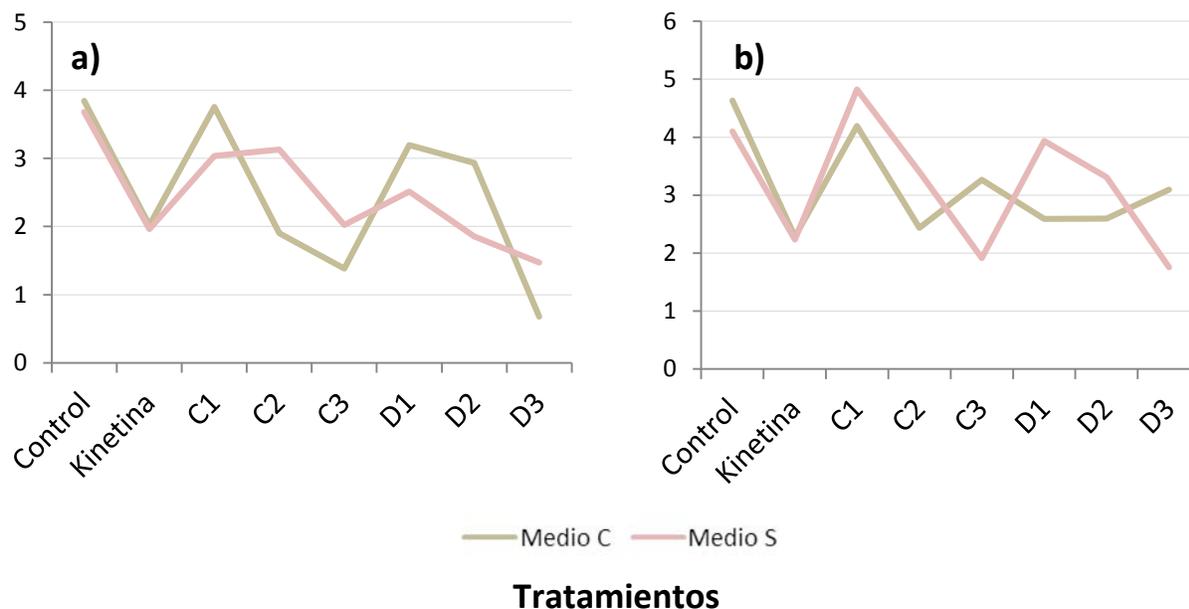
**Relación Clorofila a/b y Clorofilas/Carotenoides**

Figura 28.- Índices de la relación Clorofila a/b (a) y Clorofilas/Carotenoides (b) en *S. tuberosum* bajo diferentes tratamientos.

Respecto al índice del grupo control del medio C (3.84) los valores calculados para las plantas con adición de kinetina son entre 47.5 y 48.9% menores en el medio C y S respectivamente. Los inhibidores que tienen índices más parecidos al grupo control son todas las concentraciones de 102.6  $\mu\text{M}$  y la concentración 171.1  $\mu\text{M}$  de diuron para el medio C y de cumarina en el medio S (Fig. 28). El resto de las concentraciones son al menos 50% menores.

**Carotenoides**

El grupo control registró una concentración de carotenoides de 77.09  $\mu\text{g/g}$  (Fig. 27). Respecto a dicho valor, kinetina en medio C y en medio S indujo su disminución en 61 y 74% respectivamente. Todas las concentraciones medias y altas, excepto diuron 171.1  $\mu\text{M}$  en sacarosa 3% redujeron la cantidad de carotenoides más que kinetina. Únicamente a concentración baja los inhibidores mantuvieron al menos el 50% de los carotenoides esperados respecto al control. Cumarina 102.6  $\mu\text{M}$  incremento carotenoides en casi el triple.

## Transporte electrónico

### *Cinética de emisión de fluorescencia del fotosistema II<sup>2</sup>*

Los valores experimentales del incremento rápido de la emisión de fluorescencia del PSII en las plantas tratadas en ambos medios permitieron construir las cinéticas de fluorescencia. En ellas se observa que el grupo control de sacarosa 3% exhibió el característico incremento polifásico de emisión de fluorescencia registrando las correspondientes inflexiones O, J, I, hasta alcanzar finalmente la fase P donde mostró su fluorescencia máxima a los 600 ms (Fig. 29). La cinética de las plantas tratadas con kinetina presenta únicamente dos fases con un incremento importante en la emisión desde el inicio hasta la fase J, a partir de la cual mantiene una emisión relativamente constante, para después, alrededor de los 220 ms volver a registrar incrementos que le llevan a alcanzar la fluorescencia máxima en la fase P a los 700 ms.

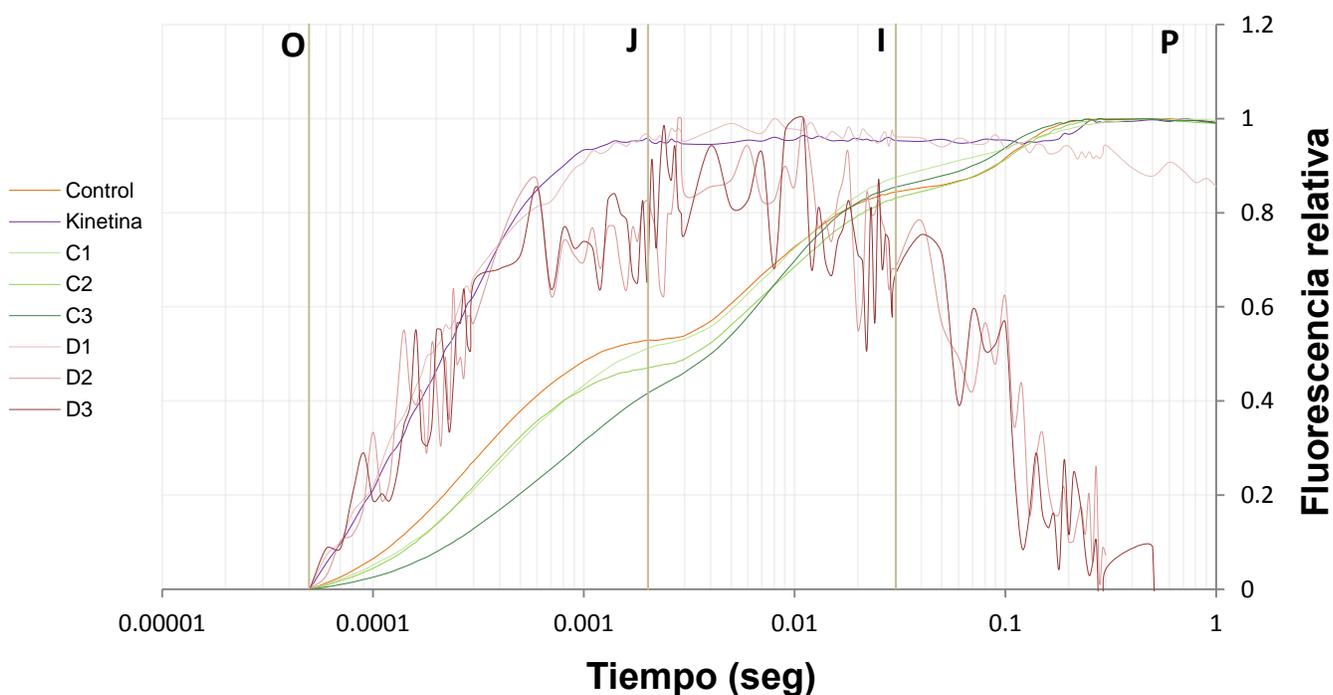


Figura 29.- Fluorescencia variable relativa de *S. tuberosum* en presencia de diferentes tratamientos en Medio C

<sup>2</sup> Dado el nivel de inhibición de crecimiento sobre *S. tuberosum* de la concentración alta de diuron, no fue posible obtener hojas con tamaño mínimo requerido para llevar a cabo la medición de emisión de fluorescencia, por lo que no se incluyen resultados correspondientes a dicha concentración.

Aquellas muestras tratadas con cumarina a diferentes concentraciones exhiben un comportamiento diferente a kinetina, ya que la emisión de fluorescencia durante la primera fase (O - J) es menor que la observada en el grupo control, y dicho decremento al llegar a la inflexión J, es mayor conforme incrementa la concentración del compuesto en el medio de cultivo, siendo cumarina 342.2  $\mu\text{M}$  la que muestra una menor emisión de fluorescencia a los 2 ms que resultó en una fase J apenas perceptible; en torno a la fase I, las tres concentraciones mostraron un comportamiento similar entre ellas y respecto al grupo control; la fluorescencia máxima de cumarina 102.6  $\mu\text{M}$  y 171.1  $\mu\text{M}$  ocurre justamente a los 500 ms, mientras que a su máxima concentración la registró a los 280 ms.

La cinética de las muestras tratadas con diuron presentó marcadas fluctuaciones a lo largo del tiempo de medición que originó curvas altamente irregulares conforme al incremento de concentración de diuron. El grupo con diuron 102.6  $\mu\text{M}$  mostró en principio, un comportamiento similar al de kinetina, con un importante aumento de emisión de fluorescencia de la fase O a la J, sin embargo, seguida de ésta, las tres concentraciones alcanzan rápidamente la fluorescencia máxima a los 8, 2.8 y 10 ms con 102.6, 171.1 y 342.2  $\mu\text{M}$  de diuron respectivamente, inhibiendo completamente la aparición de una fase I. Seguido de estos incrementos máximos, comienza un declive en la emisión de fluorescencia que ocurre con mayor velocidad en las concentraciones media y alta.

La comparación de la cinética de fluorescencia de los cultivos en 3 y 6% de sacarosa (Fig. 30) permite observar que, la emisión es ligeramente más alta en el medio con sacarosa al 6% que en el medio con sacarosa al 3%. El comportamiento inicial de la curva hasta poco antes de alcanzar la fase J resultó similar con ambos medios, no obstante, entre los 1.8 y 3 ms, el grupo control del medio S mostró los valores más altos de fluorescencia a pesar de lo cual continuó con la cinética esperada hasta llegar a una fase P poco perceptible, con una fluorescencia máxima a los 500 ms.

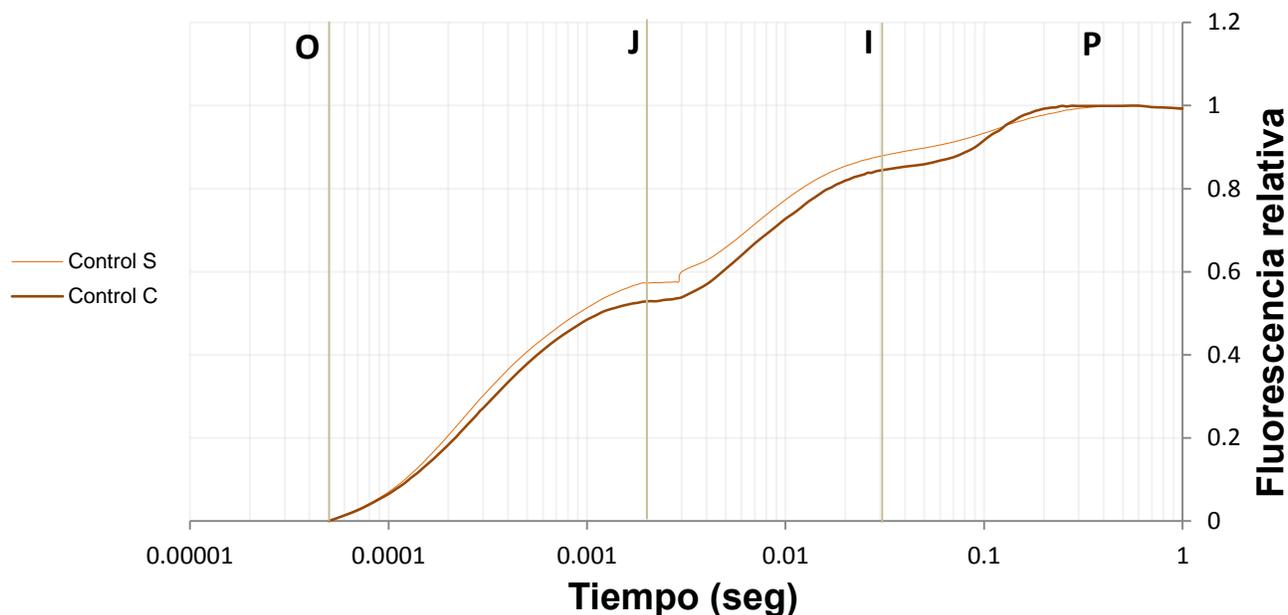


Figura 30.- Comparación de la emisión de fluorescencia relativa de *S. tuberosum* entre grupos control de ambos medios de cultivo.

El grupo de *S. tuberosum* cultivadas en medio S y tratadas con kinetina registró una emisión de fluorescencia mayor entre el inicio y la fase J, que tiende a solaparse con la curva del grupo control hasta llegar a la fluorescencia máxima en la fase P a los 400 ms (Fig. 31). Aquellas plantas tratadas con cumarina en concentración baja y media muestran una cinética similar al grupo control, sin embargo la concentración 102.6  $\mu\text{M}$  exhibió una fluorescencia ligeramente mayor en la fase O – J con tendencia a acoplarse sobre la curva control en la fase J - I, mientras que con cumarina 171.1  $\mu\text{M}$  el comportamiento fue inverso, compartiendo la pendiente inicial de la curva control para desacoplarse alrededor de la fase J con un incremento en la fluorescencia. La concentración 342.2  $\mu\text{M}$  de cumarina reflejó una emisión de fluorescencia más alta desde un principio y tiende a solaparse hasta la fase P con el control. El tiempo requerido para alcanzar la fluorescencia máxima fue de 220, 300 y 280 ms para las tres concentraciones respectivamente.

Todas las muestras con diuron presentaron las fluorescencias más altas y tempranas para la fase O – J en proporción a la concentración en que dicho inhibidor estuvo presente. Posterior a la

fase J, se mantuvieron fluorescencias relativamente constantes (con ciertas fluctuaciones), hasta que la concentración de diuron 102.1  $\mu\text{M}$  registró su fluorescencia máxima a los 400 ms, mientras que diuron 171.1  $\mu\text{M}$  la presentó poco después de la fase J, a los 3 ms.

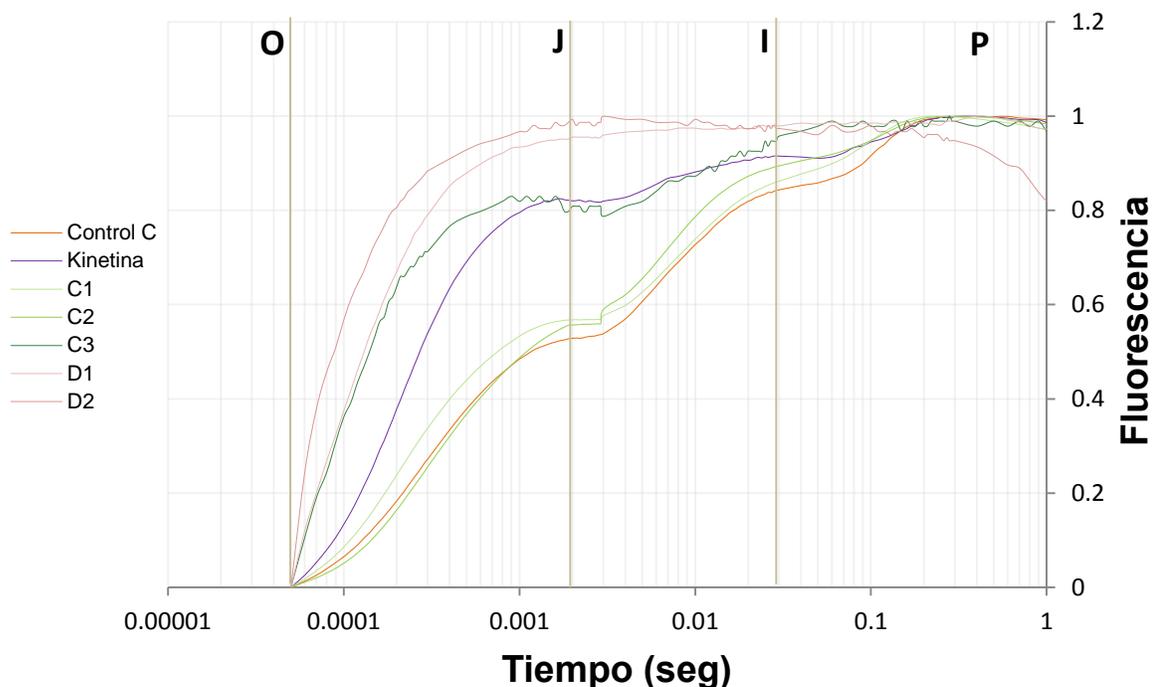


Figura 31.- Fluorescencia variable relativa de *S. tuberosum* en presencia de diferentes tratamientos en Medio S respecto al control C

### Prueba JIP: Flujos específicos (por Centro de Reacción)

Los flujos de energía por centro de reacción (Fig. 32 - 35) y sus rendimientos, así como los flujos fenomenológicos fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones presentadas por Strasser y colaboradores (2000) como parte de la prueba JIP, los resultados se presentan a continuación.

### Absorción (ABS/RC)

La tasa de absorción por centro de reacción respecto al grupo control del medio C indica que, el tratamiento con kinetina tuvo una tasa 34% mayor, mientras que aquellas muestras tratadas con cumarina tuvieron en general, una menor cantidad de fotones absorbidos por centro de reacción en relación a la cantidad en que cumarina estuvo presente, siendo aquellas muestras tratadas con la concentración más alta las que tuvieron la tasa de absorción más baja (47%). En comparación con lo

anterior, los tratamientos con diuron arrojaron proporciones más elevadas, de 12.3 a 66.4 veces cuando se aplicó a concentración baja y alta respectivamente. Este mismo parámetro en los cultivos de medio rico en sacarosa indica incrementos por parte de casi todos los tratamientos respecto su grupo control, siendo la única excepción C2 que disminuyó en 30% la tasa mencionada mientras el resto de muestras tratadas con cumarina a 102.66 y 342.23  $\mu\text{M}$  mostraron incrementos de entre 1.3 y 320% respectivamente. Kinetina por su parte, fue 3 veces superior, al igual que diuron (de 5.5 a 19 veces cuando se aplicó a la concentración baja y alta).

### Atrapamiento (TR/RC)

De acuerdo con la tasa que expresa la proporción de excitones atrapados por centro de reacción, cumarina provocó una menor proporción de atrapamiento respecto al grupo control, hasta en 39.7% cuando estuvo presente en concentración alta, siendo la concentración media la que menos efecto presentó. Los datos obtenidos para diuron muestran que, a cualquier concentración hubo incrementos en la tasa, desde 30% (a 102.66 y 171.11  $\mu\text{M}$ ) hasta 94.3% con 342.23  $\mu\text{M}$ . Kinetina con un flujo 27% mayor, mostró un incremento similar a los mencionados por 102.66 y 171.11  $\mu\text{M}$ . Los tratamientos del medio S indican que la tasa de atrapamiento de kinetina respecto al grupo control aumentaron 26.4%. Cabe destacar que la concentración alta de cumarina indujo un incremento del 71% sobre lo observado en aquellas muestras sin tratamiento. Un efecto similar se observó con 102.66 y 171.11  $\mu\text{M}$  de diuron con incrementos del 60 al 72% respectivamente.

### Transporte electrónico (ET/RC)

La proporción del flujo de transporte electrónico más allá de  $Q_A$  indica que, entre aquellas muestras tratadas con cumarina, las expuestas a la concentración alta fueron quienes mayormente se vieron afectadas (25% menos flujo respecto al grupo control). Las *S. tuberosum* que crecieron en presencia diuron 102.66  $\mu\text{M}$  mostraron una reducción de 99.4% del flujo electrónico, destacando que cuando la concentración fue mayor (171.11  $\mu\text{M}$ ) el efecto disminuyó a 50% y con concentración alta hubo una ausencia de efecto sobre dicho parámetro, ya que la proporción de flujo calculada resultó equiparable a la del grupo control (3% mayor). En general, con los grupos creciendo en medio S ésta relación de flujo decreció por efecto de todos los tratamientos. Con kinetina hubo una importante disminución del 88%, mayor que lo calculado para aquellas muestras con cumarina donde 102.66  $\mu\text{M}$

provocó un ligero incremento en la tasa de 15%, 171.11  $\mu\text{M}$  comenzó a marcar una disminución en 15% y la concentración alta de 30%. Diuron demostró tener un efecto similar a kinetina cuando fue aplicado a baja y principalmente media concentración reduciendo en 102% el flujo de transporte electrónico.

### Disipación (DI/RC)

El flujo de disipación establecido por centro de reacción fue menor en las muestras tratadas con cumarina, específicamente a concentración media y alta que disminuyeron entre 37 y 74% respectivamente la tasa de energía disipada cuando se les comparó con aquella del grupo control. En general, diuron incrementó notoriamente la proporción mencionada pues, a concentración baja se calcula un valor 32 veces mayor a lo observado en su ausencia y hasta 191 veces cuando estuvo presente en concentración media. Kinetina provocó un incremento del 44% en la disipación, similar a lo registrado con la concentración media de cumarina. Aquellas *S. tuberosum* creciendo en sacarosa abundante incremento el flujo de disipación 6 veces la reportada por el control cuando fueron tratadas con kinetina. Cumarina mostró efectos variables en base a la concentración aplicada, destacando que 171.11  $\mu\text{M}$  le disminuyó en 22%, 102.66  $\mu\text{M}$  en 61% y la alta incremento hasta 8 veces lo registrado con el grupo control. Las dos concentraciones de diuron indujeron las tasas de disipación más altas del medio con valores 12 a 49 veces mayores.

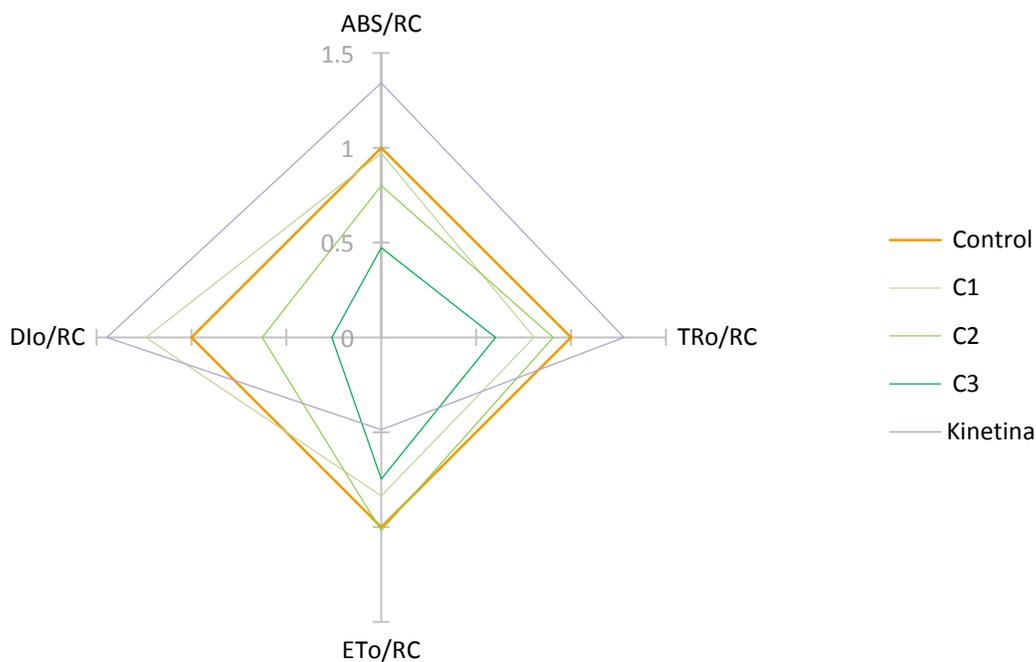


Figura 32.- Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de cumarina respecto al control y kinetina (medio C).

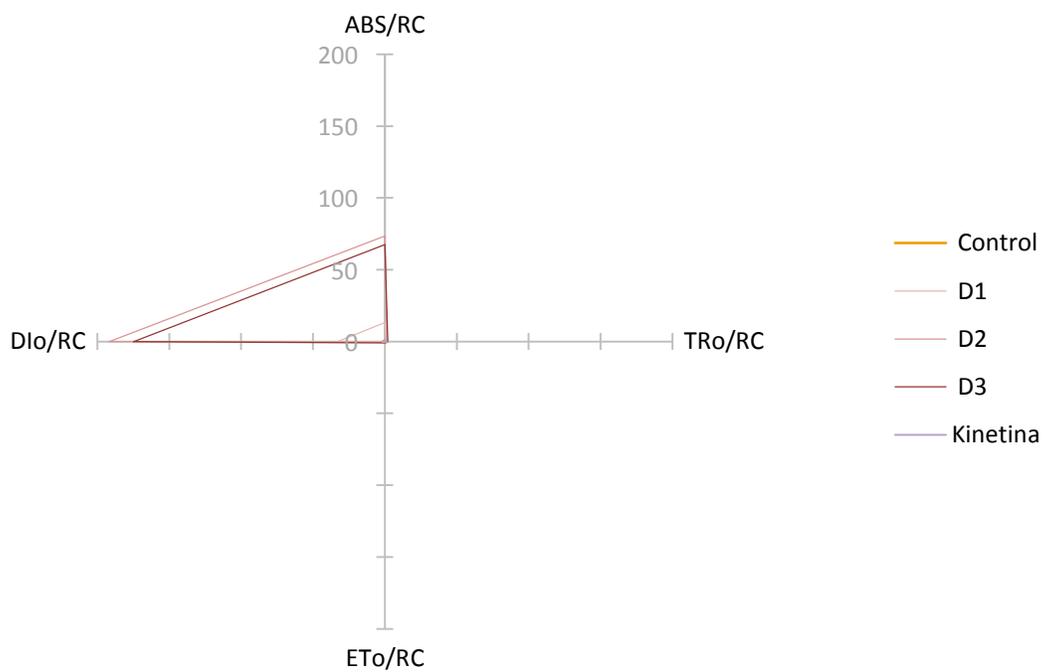


Figura 33.- Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de diuron respecto al control y kinetina (medio C).

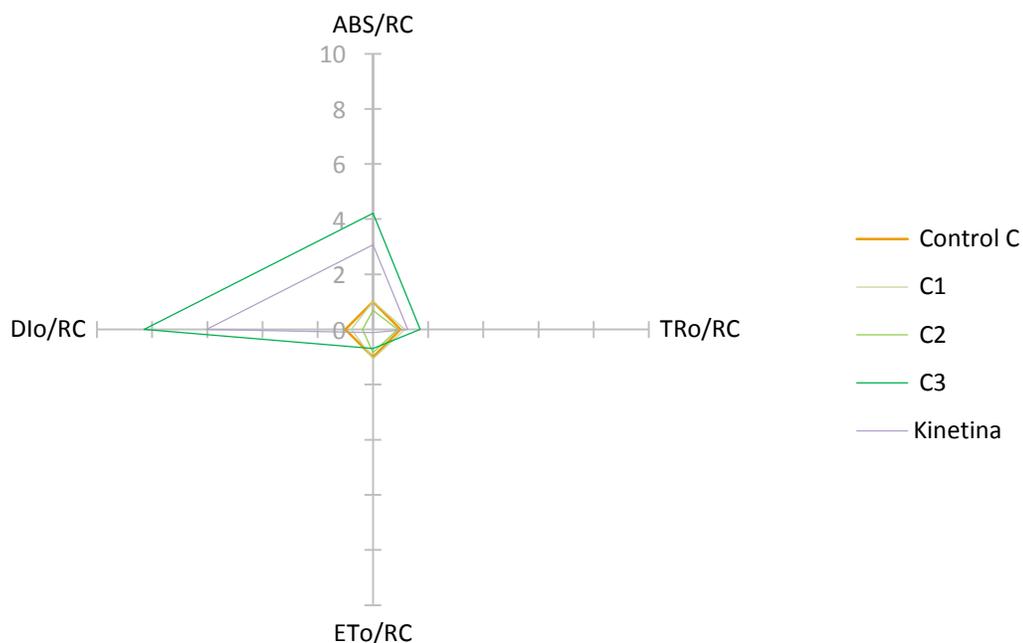


Figura 34.- Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de cumarina respecto al control C y kinetina (medio S).

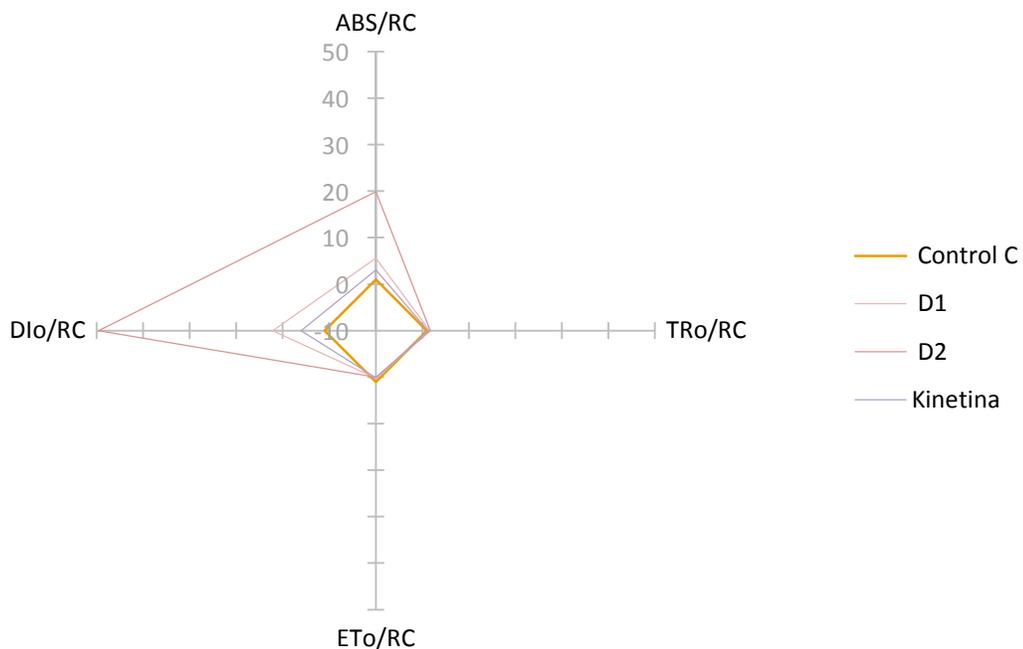


Figura 35.- Comparación de los flujos de energía por centro de reacción activo en *S. tuberosum* en presencia de diuron respecto al control C y kinetina (medio S).

**Prueba JIP: Rendimientos cuánticos**

En general, la eficiencia o rendimiento de la fotoquímica primaria ( $\phi P_0$ ), la posibilidad de que un fotón mueva un electrón hacia la cadena transportadora de electrones ( $\phi E_0$ ), y de que un excitón mueva un electrón más allá de QA en la cadena transportadora ( $\psi_0$ ) en las plantas creciendo en medio C demuestran que, no obstante que cumarina aplicada en baja concentración disminuyó en 16.9 y 13.9% a  $\phi P_0$  y  $\phi E_0$  respectivamente, destaca el efecto positivo de las concentraciones 171.11 y 342.23  $\mu\text{M}$  sobre el transporte electrónico en *S. tuberosum* var. alpha, lo cual se vio reflejado en un máximo incremento de 23% en  $\psi_0$ , 27% para  $\phi P_0$  y de 57% en  $\phi E_0$  en el caso de 342.23  $\mu\text{M}$  (Fig. 36). Los cálculos para las muestras con diuron indican una reducción notable en los tres parámetros con cualquier concentración, principalmente sobre el rendimiento fotoquímico primario y la probabilidad de que un fotón mueva un electrón hacia la cadena transportadora de electrones, siendo la concentración baja la que mayor impacto tuvo al reducir en 90, 99.6 y 99.9% a  $\phi P_0$ ,  $\psi_0$  y  $\phi E_0$  respectivamente. De manera particular, el efecto de diuron sobre  $\psi_0$  fue menor (de 99 a 46%) conforme se incrementó la concentración del compuesto. Kinetina demostró disminuir los rendimientos, específicamente de  $\phi E_0$  (-63.6%) y  $\psi_0$  (-61.8%).

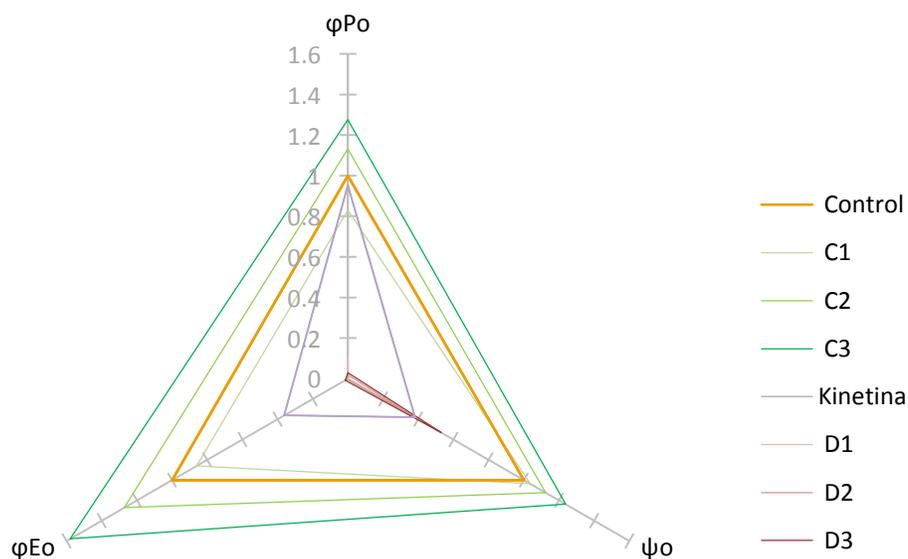


Figura 36.- Comparación de rendimientos cuánticos de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control y kinetina (sacarosa 3%).

En el medio de cultivo rico en sacarosa (Fig. 37), la presencia de kinetina disminuyó entre 58 y 96% los rendimientos. Cumarina disminuyó  $\psi_0$  gradualmente en 8 a 59% conforme al aumento en la concentración, mientras que  $\varphi P_0$  y  $\varphi E_0$  fueron estimulados por las concentraciones baja y media e inhibidos a la concentración alta en 59 y 83% respectivamente.

La disminución de los rendimientos en las plantas creciendo en presencia de diuron (91% en  $\varphi P_0$  y 100 en  $\varphi E_0$  y  $\psi_0$  para 171.11  $\mu\text{M}$ ) fue proporcional al incremento de la concentración.

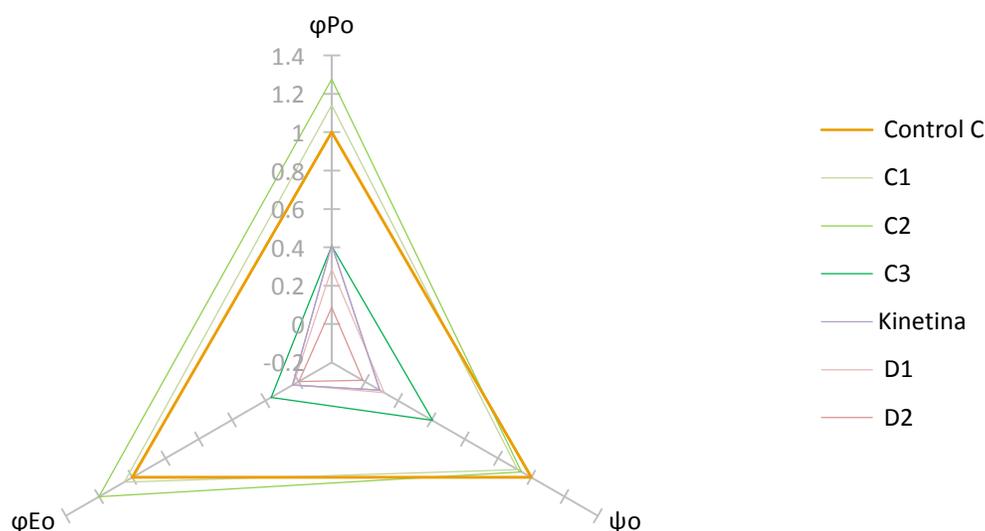


Figura 37.- Comparación de rendimientos cuánticos de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control C y kinetina (sacarosa 6%).

### ***Efecto de la concentración de sacarosa sobre los rendimientos y flujos de energía***

Se compararon las tasas de flujo y densidad de centros de reacción activos entre grupos control de ambos medios de cultivo con la finalidad de observar el efecto del incremento de sacarosa sobre dichos parámetros encontrando que, a pesar de que las eficiencias fotoquímicas y de transporte electrónico más allá de  $Q_A$  no se vieron mermadas (crecieron 23.7 y 12.37% respectivamente),  $\psi_0$  registró un ligero decremento del 9.2% (Fig. 38b). Respecto a las tasas de flujo por centro de reacción activo (Fig. 38a), se observó que la absorción se vio ligeramente afectada y la proporción de energía disipada decreció en 49.4% mientras que los flujos de atrapamiento y transporte electrónico se

mantuvieron casi constantes respecto al grupo control del medio de cultivo con cantidad normal de sacarosa. No obstante los parámetros de flujo analizados por área activa (Fig. 38c) de hoja indican una caída importante en los valores de todas las tasas (mínimo 90%) principalmente sobre la densidad de centros de reacción activos (-93.4%).

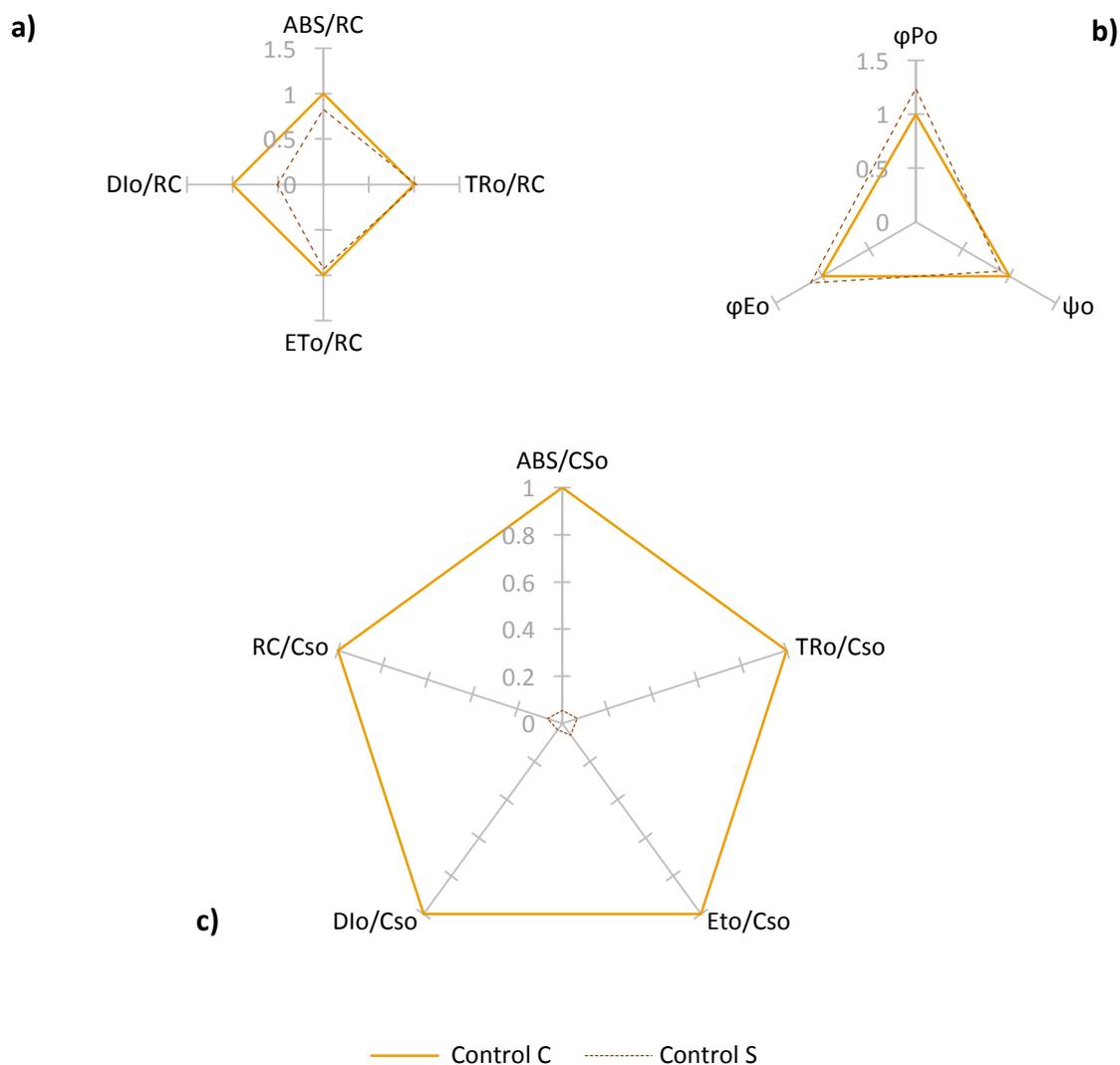


Figura 38.- Comparación de flujos de energía por centro de reacción (a), por área activa (b) y rendimientos cuánticos (c) de *S. tuberosum* en medio de crecimiento y medio rico en sacarosa.

**Prueba JIP: Flujos fenomenológicos (por área transversal de hoja)**

Los cálculos de flujos de energía por área transversal de hoja en los cultivos de medio C (Fig. 39) indicaron que, respecto al grupo control, los flujos de absorción y atrapamiento por área activa fueron ligeramente mayores en las plantas expuestas a kinetina, sin embargo también lo fue la disipación (-21.8%); al mismo tiempo, la densidad de centros de reacción activos fue un 15.7% menor, al igual que el flujo de transporte electrónico más allá de  $Q_A$  que redujo su tasa a menos de la mitad (-58%). Por su parte, cumarina tuvo comportamientos diferentes en base a la concentración en que estuvo presente; particularmente, la concentración baja no registro efecto negativo notorio sobre algún flujo ya que a excepción de la tasa de atrapamiento por área transversal que disminuyó 3.2% y la tasa de disipación que se incrementó 48.8%, el flujo de absorción fue 16.5% mayor al igual que la densidad de centros de reacción (20%); la tasa de flujo del transporte electrónico se mantuvo intacta respecto al grupo control. Cuando cumarina estuvo presente a 171.11 y 342.23  $\mu\text{M}$ , todas las tasas de flujo disminuyeron al menos en 40% y la densidad de centros de reacción un 20%, siendo aquellas plantas tratadas con la concentración media las que mayormente se vieron afectadas (hasta 62% menos absorción y atrapamiento, así como 57% menos densidad de centros activos y transporte electrónico); la tasa de disipación tuvo un decremento importante de entre 73 y 79% respectivamente. La presencia de diuron produjo reducciones importantes en las tasas de flujo correspondientes al atrapamiento y transporte electrónico de entre el 89 y 98% para el primero con 102.66 y 342.23  $\mu\text{M}$  respectivamente, y del 99% para el transporte con cualquier concentración; de igual manera la densidad de centros activos sufrió una reducción importante del 91 a 99% con la concentración baja y alta respectivamente; en menor medida se vio afectada la tasa de absorción que se redujo 8.1, 22.8 y 58.2% conforme al incremento en la concentración; dichos efectos se vieron reflejados en la tasa de disipación que se elevó de manera particularmente importante con la concentración baja a media (167 y 101% respectivamente).

En las plantas que crecieron en medio S (Fig. 40), se puede observar que los flujos por área transversal con kinetina fueron afectados de diferente forma ya que mientras la tasa de absorción se incrementó en 27%, los flujos de atrapamiento y transporte fueron 47 y 95% menores y la disipación se incrementó en más del doble, mientras que la densidad de centros de reacción decayó en más de

la mitad respecto al control. Los flujos en muestras expuestas a cumarina fueron en su totalidad menores al menos en un 89% a los registrados en el grupo control, situación similar a los resultados obtenidos con diuron, excepto que los decrementos en la energía de absorción y disipación fueron ligeramente menores.

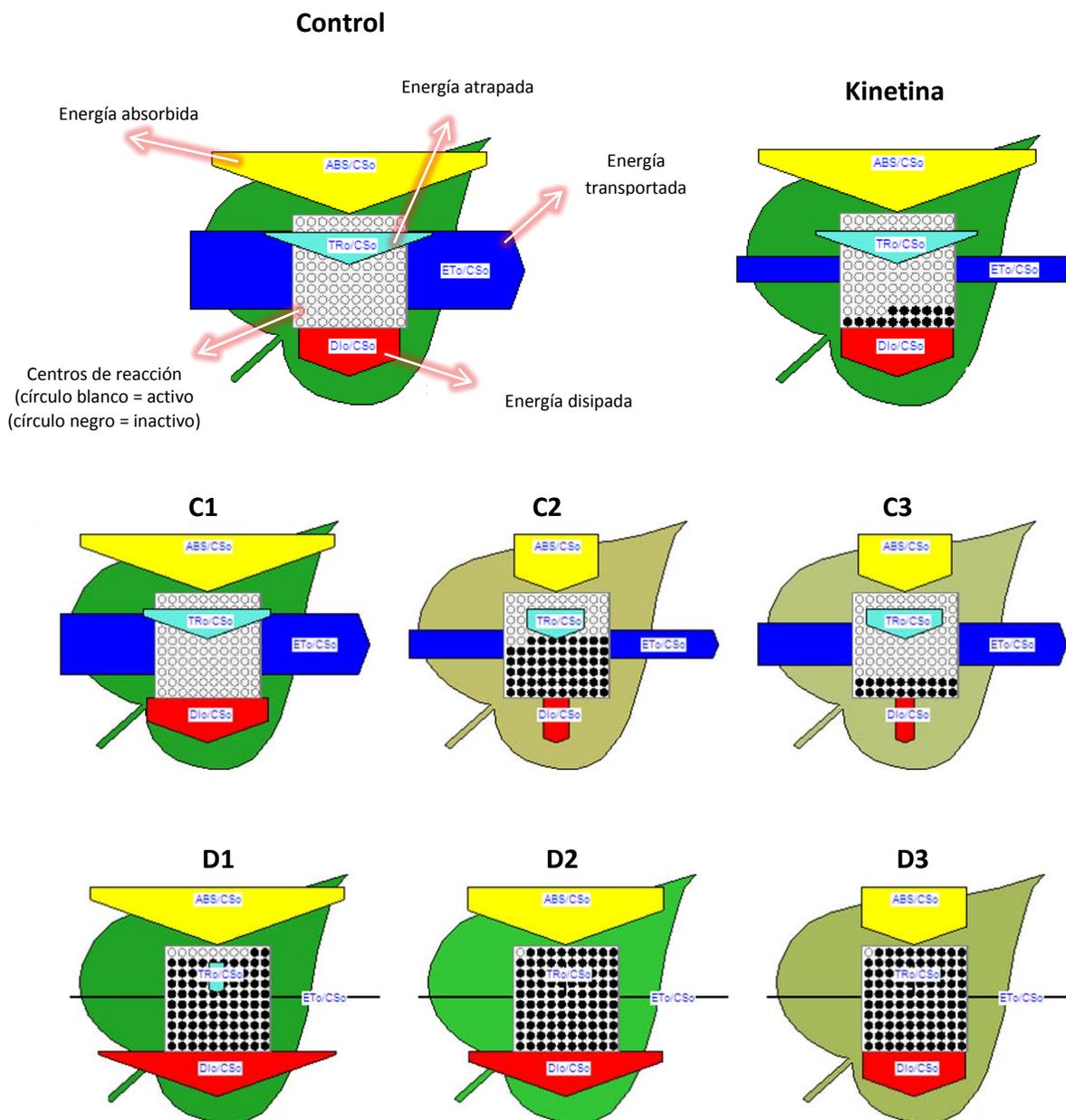


Figura 39.- Modelo de hoja de los flujos de energía por área transversal de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control y kinetina (medio C).

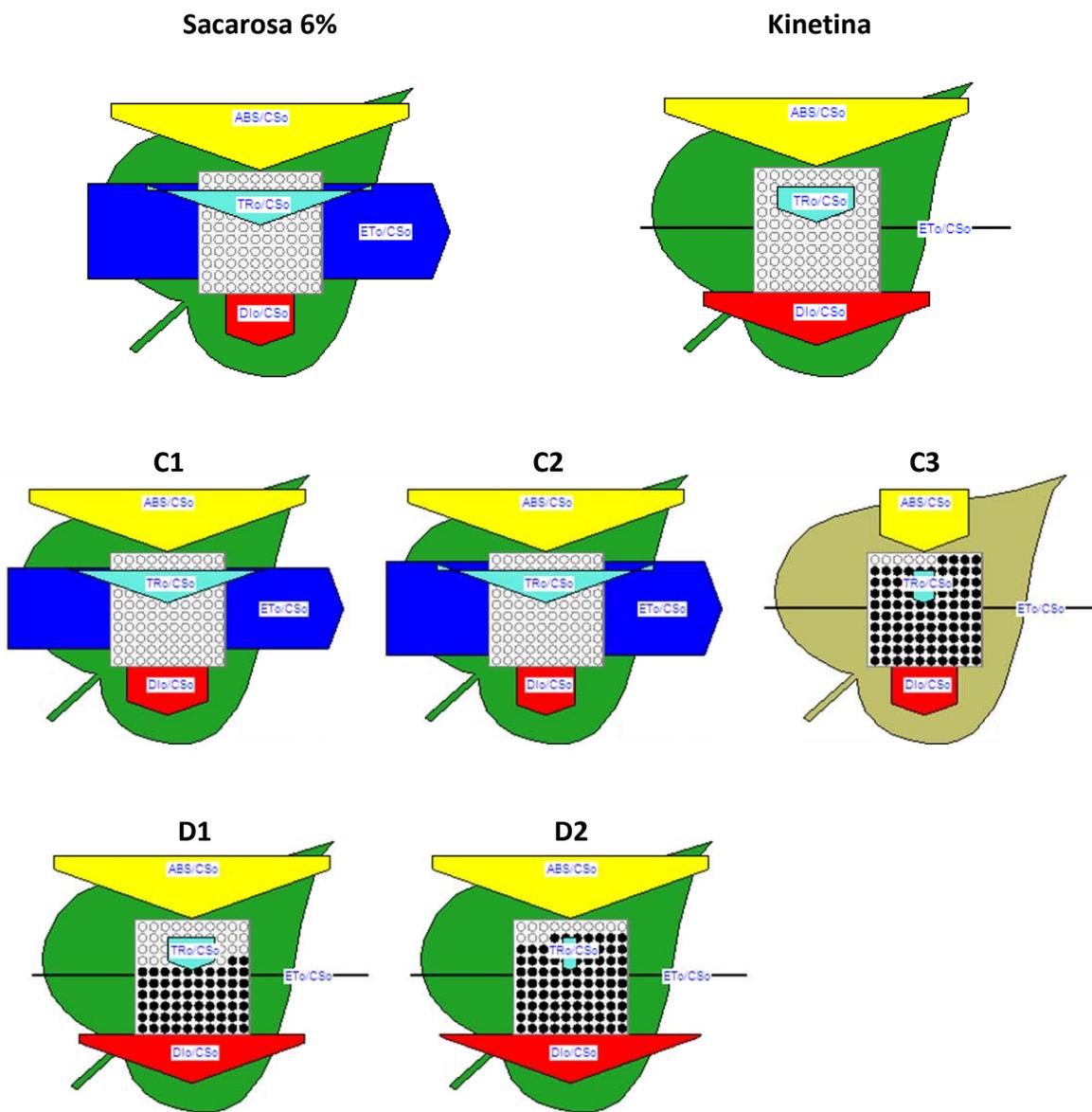


Figura 40.- Modelo de hoja de los flujos de energía por área transversal de *S. tuberosum* en presencia de cumarina y diuron respecto al control y kinetina (medio S).

## **DISCUSIÓN**

### **Tuberización y desarrollo vegetativo**

Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que, en el periodo de 30 días de crecimiento la sacarosa por sí misma no indujo tuberización alguna sobre plántulas de *S. tuberosum* var. alpha a concentración de 3%, y que a pesar de haber formación de tubérculos visibles con 6%, el nivel registrado no fue significativo (Fig. 17). Esto confirma lo observado en la literatura, pues a pesar de que la sacarosa actúa como el sustrato en la biosíntesis de almidón en la papa y un ambiente pobre en azúcares produce tuberización tardía y débil por lo cual generalmente necesita estar inmersa en altas concentraciones de azúcares para tuberizar pues favorecen en su genes encargados de codificar productos que auxilian a establecer la capacidad de utilización, importación y almacenamiento (Koch, 1996; Dieme *et al.*, 2001; Lakhoua & Ellouze, 1990 en Dieme *et al.*, 2001.), se ha demostrado que el nivel de sacarosa por sí mismo no es suficiente para inducir la formación de tubérculos (Gregory, 1954 y Lovell & Booth, 1967 en Palmer & Smith, 1970 ) y por tal, se deduce que el proceso de iniciación es dependiente de otras sustancias o estímulos específicos (Palmer & Smith, 1970).

El desarrollo vegetativo en los cultivos con sacarosa al 3% se caracterizó por brotes vigorosos y pubescentes, en promedio de 57 mm, con hojas grandes, expandidas, coloración saludable y con un desarrollo radicular óptimo (Fig. 19 y 20). Los resultados obtenidos indican que el crecimiento promedio de la variedad alpha en cultivo *in vitro* es semejante al reportado por Hussey & Stacey (1981) para las variedades arran pilot, majestic y king-edward con plántulas de 30 a 50 mm de altura en condiciones de sacarosa y tiempo similares (30 días en 3% de sacarosa), sin embargo la mayoría de las investigaciones consultadas sugieren que el crecimiento de *S. tuberosum* var. alpha en el presente estudio fue menor a lo que podría esperarse con otras variedades, como norland, sandy, desirée, igor y petland-squire que alcanzaron alturas de 75 a 99.1 mm en periodos de tiempo similares a mayores (Badr, 2011; Mohamed & Alsdon, 2010; Anzlovar y colaboradores, 1995). Esta diferencia en la altura del grupo control se atribuye a las diferencias en el tiempo de exposición a la

luz, ya que se ha reportado que fotoperiodos cortos (8h) influyen en el crecimiento de la papa, acortando su crecimiento. (Ferne & Willmitzer, 2001; Jackson, 1999; Kooman, 1995).

El incremento a 6% de sacarosa dio paso a brotes significativamente pequeños, encorvados, de coloración promedio y hojas delgadas, con sistema radicular presente y engrosamientos puntuales en el vástago que no llegan a formar tubérculos bien definidos (Fig. 19 y 24a). Aquellas plantas que sí logran formar tubérculos definidos muestran una coloración café-amarillo. Se propone que esta reducción en el tamaño de los brotes a pesar de no haber tuberizado se debe al acentuado hábito mixotrófico adaptado por los cultivos en presencia de una cantidad abundante de sacarosa; lo anterior con base en estudios donde se revela que al comparar cultivos *in vitro* fotoautótrofos de papa (sin adición externa de sacarosa al medio) y mixotróficos (con fuente externa de sacarosa), los segundos tuvieron una baja actividad fotosintética y estuvieron pobremente desarrollados con alturas significativamente menores en el medio con sacarosa, atribuyéndolo al estrés ejercido por la acumulación de numerosos fotosintatos (Badr, 2011).

Kinetina por otra parte, mostró tener por sí misma y en combinación con sacarosa abundante (6%), una actividad inductora significativa sobre la formación de tubérculos aplicada a 16  $\mu$ M (Fig. 19). Dicha actividad confirma los reportes previos donde se ha observado efecto promotor de la formación de estolones y su consecuente tuberización en cultivos de papa *in vitro* adicionados con citoquininas (Hussey & Stacey, 1984; Dieng, 1993 en Dieme *et al.*, 2001), así como los resultados previamente obtenidos por Palmer & Smith (1969) quienes demostraron que kinetina impulsa una respuesta favorable en la inducción de formación de tubérculos, sin embargo, contrario a sus observaciones (Palmer & Smith, 1970) los porcentajes de tuberización obtenidos en el presente estudio con kinetina y 3% de sacarosa, confirman que esta citoquinina es por sí misma un inductor de la tuberización que ejerce un efecto significativo independientemente de una limitación en la cantidad de sacarosa externa disponible. Acerca del mecanismo de acción, estos mismos autores han señalado que el nivel endógeno de inhibidores del crecimiento es esencial en la formación de tubérculos y sugieren en un primer momento que posiblemente el efecto de kinetina en la iniciación de tubérculos es activado cuando es transportada a los sitios de acción, estimulando procesos metabólicos no

asociados a la síntesis de proteínas, activando enzimas pre-existentes esenciales para la síntesis y acumulación de almidón, posteriormente añaden que la naturaleza de kinetina como citoquinina le otorga actividad promotora de la división celular, al tiempo que inhibe la elongación y estimula el ensanchamiento de las mismas, y como hormona movilizadora de moléculas. (Palmer & Smith, 1969; 1970). Previo a la aparición de tubérculos en el presente trabajo, se registraron algunos engrosamientos puntuales, los cuales al formar tubérculos visibles exhiben coloración café-rojiza; al respecto, la información disponible menciona que el color de la piel y pulpa de los tubérculos está determinado en función de la presencia de determinados compuestos fenólicos, los cuales están altamente concentrados en la cascara de los tubérculos, la coloración roja por ejemplo está asociada a la presencia de antocianinas, especialmente glucósidos acilados de pelargonidina y pueden llegar a contener el doble de ácidos fenólicos en comparación a las variedades blancas (Bianeth y Restrepo, 2013).

La presencia de kinetina indujo el desarrollo de brotes significativamente pequeños y delgados, de coloración débil, presencia de hojas reducidas con esclerosamientos y ensanchamiento de la base del explante con un sistema radicular prácticamente ausente (Fig. 19, 21a y 24b). De acuerdo con investigaciones previas, estos cambios pueden estar relacionados con una reducción en los niveles de giberelina, (GA) hormona involucrada en la interrupción del periodo de dormancia de las plantas y se cree que en la generación/transporte de señales inductoras de la tuberización. Por lo que una reducción de GA guarda también relación directa con el estímulo inductor de la formación de tubérculos en *S. tuberosum* con la consecuente reducción en el crecimiento del tallo y estolones por la canalización de los fotosintatos hacia el desarrollo de tubérculos (Dyson & Humphries, 1963 y Dyson, 1965 en Palmer & Smith, 1969). Por estas razones es sabido que a la inducción de la tuberización preceden una serie de cambios morfológicos en la planta, como el mencionado cese de crecimiento de tallos, hojas, ramificación axilar y la promoción de una senescencia apresurada donde las plantas se tornan pálidas como resultado de los cambios en el nivel de pigmentos como clorofilas y antocianinas (Martínez-García, 2002)

Cumarina a partir de una concentración de 171.1  $\mu\text{M}$  es capaz de inducir una tuberización significativa por sí sola y en presencia de sacarosa abundante, siendo esta última un factor que en combinación, permite a cumarina expresar la actividad inductora a concentraciones menores (Fig. 17, 22 y 25). Estos resultados coinciden con la investigación de Stallknecht & Farnsworth (1982) quienes demostraron que brotes axilares cultivados en medio con cumarina tuberizan fácilmente, especialmente a concentraciones de 25 a 50 mg. A pesar de que se considera 6 y 8% de sacarosa como la concentración óptima de carbohidratos para la inducción con cumarina, el presente estudio indica que aun en presencia de un nivel más bajo de azúcares (3%), el compuesto fenólico fue capaz de inducir 100% de tuberización antes de los 30 días de cultivo.

De acuerdo a lo esperado (Stallknecht, 1972), dichos tubérculos fueron más grandes que aquellos formados con kinetina. En contraste López (2013), observó una débil actividad inductora (20% de plantas tuberizadas) en *S. tuberosum* var. tollocan, especialmente a concentraciones altas y a pesar de la presencia de sacarosa abundante y demás condiciones favorables por lo que la disponibilidad de carbohidratos, fotoperiodo y temperatura no fueron los factores limitantes en tal caso; ante ello resulta posible que algún factor como los niveles endógenos (o inducidos por el sellado de los cultivos) de ácido absísico y/o etileno en los cultivos ejercieran un papel inhibitor sobre la actividad de cumarina, pues se ha demostrado que estos compuestos bajo determinadas condiciones como tiempo de exposición y concentración, son probados reguladores de la formación de tubérculos.

Acerca del origen de actividad de cumarina y de todos los compuestos afectando el proceso de tuberización estudiados, no se tiene certeza si se debe a una participación directa o a la influencia que ejercen sobre la concentración endógena de promotores del crecimiento como la mencionada giberelina, y hasta el momento no se ha provisto evidencia sólida sobre una función fisiológica o mecanismo a nivel molecular para los tejidos vegetales (Bougard *et al.*, 2006). Un escenario plantea que cumarina participa en la tuberización ejerciendo efecto sobre la concentración endógena hormonal alterando la relación giberelina/inhibidor (Stallknecht & Farnsworth, 1982). Tal planteamiento adquiere peso al considerar que cumarina puede tanto estimular como inhibir el

proceso de crecimiento en otras plantas (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1961 en Stallknecht & Farnsworth, 1982; Neuman, 1959; Audus, 1954) llegando a considerarla por sí misma un regulador de crecimiento de aparición natural (Neuman, 1959).

Adicionalmente se ha comprobado que una cumarina de nombre escopoletina se encuentra presente en el denominado complejo  $\beta$ -inhibidor en tubérculos de la planta de papa (Housley & Taylor, 1985), la cual junto con el resto de las cumarinas hidroxiladas y metoxiladas están envueltas en las respuestas de las plantas ante estresantes bióticos y abióticos, principalmente puede estar involucrada en la reducción de estrés oxidativo y los investigadores concuerdan en que es sintetizada a partir del ácido ferúlico como respuesta por parte del citocromo P450 (Gutierrez *et al.*, 1995), por acción de enzimas de tipo peroxidasa (Arango, 2010).

La actividad reguladora de las cumarinas proviene de su naturaleza como compuestos fenólicos ya que algunos autores explican que tales compuestos pueden exhibir un comportamiento a manera de hormona, inhibiendo o estimulando procesos como la elongación radicular, la división celular, engrosamiento del espesor celular, alterar la actividad de ciertas enzimas y reducir o inactivar la actividad de determinadas hormonas vegetales, síntesis de proteínas e incluso cambiar la ultraestructura interfiriendo con el desarrollo normal del organismo completo (Bougard *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Stallknecht, 1972).

En la presente investigación, los tubérculos inducidos por cumarina presentaron una coloración que va del café claro a completamente pálida (Fig. 22 y 25), ante lo cual, Krajčovič y colaboradores (1989) explican que el blanqueamiento celular se encuentra asociado a la degradación y pérdida de cloroplastos.

Sobre su efecto en el desarrollo, en el presente estudio resaltó que particularmente la concentración que no indujo el desarrollo de tubérculos de manera significativa (102.6  $\mu\text{M}$ ) originó el crecimiento de brotes altos, erguidos, engrosados y con un sistema radicular prolífero (Fig. 21b). Este evento se atribuye a que la presencia de cumarina es capaz de ejercer actividad mitigadora del estrés,

pero en ausencia del mismo y a concentraciones no inductoras de la formación de tubérculos, su actividad pudo verse reflejada en la estimulación un desarrollo más vigoroso; por ejemplo, Audus (1954) ha reportado que cumarina promueve la formación de raíces laterales. En la presente investigación, el resto de las concentraciones redujo gradualmente el crecimiento de los brotes de *S. tuberosum* a medida que incrementó su concentración (y actividad tuberizante), lo mismo ocurrió con raíces, así como con el tamaño y presencia de hojas en las cuales llegó a originar áreas de coloración rojiza, observándose un impacto significativo a concentración de 342.2  $\mu\text{M}$  (Fig. 21c, 22 y 25). Nuevamente las observaciones coinciden con Stallknecht & Farnsworth, 1982 donde los brotes tuberizados exhiben poco o nulo crecimiento de elongación, con una gran cantidad de raíces engrosadas (Li *et al.*, 2010). Los datos aquí reportados indican que en combinación con sacarosa abundante, el efecto de cumarina se hace más evidente desde concentraciones menores. Con base en la propuesta de Koch (1996), quién describe los efectos de la disponibilidad de carbohidratos sobre la expresión de genes específicos, la presencia de sacarosa puede complementar o amplificar la influencia de controles metabólicos; así, es posible deducir que 6% de sacarosa amplificó la actividad de cumarina sobre la regulación del crecimiento y tuberización.

Por su parte, diuron no provocó un nivel de tuberización significativo bajo ninguna concentración por sí sola ni en combinación con sacarosa abundante (Fig. 17). Contrario a lo esperado y a pesar de reducir gradualmente la altura de las plántulas conforme incrementa la concentración, genera una presencia importante de lenticelas y un sistema radicular reducido (Fig. 23b,c), este herbicida también produce brotes con hábito estolonífero y crecimiento diageotrópico con la particularidad de estar altamente ramificados, tener una mayor cantidad de hojas de tamaño mixto (Fig. 23a y 26a) y contar con la presencia de engrosamientos en ciertas zonas del vástago que se generalizan a toda la plántula bajo concentraciones mayores del inhibidor sin llegar a formar tubérculos definidos en la mayoría de los casos (Fig. 26b,c) y no existe evidencia de interacción significativa con la presencia de sacarosa abundante. Estas características observadas en la presente investigación son consistentes con la descripción de plantas expuestas al efecto de etileno, y considerando que el etileno es una hormona asociada a situaciones estresantes para las plantas aunado a que estudios demuestran que la adición de DCMU en plantas de Cadillo (*Xanthium*

*strumarium* L.) permitió mayores niveles de liberación de etileno (Grodzinski & Boesel, 1981), es posible atribuir los resultados en el desarrollo vegetativo a la síntesis de etileno en *S. tuberosum* inducida como resultado de la exposición de los cultivos a diuron.

La acumulación de etileno en los cultivos sellados afecta profundamente el desarrollo de las hojas y tallos (Hussey & Stacey, 1981), al inhibir el crecimiento longitudinal y promover la expansión radial de los tejidos, mientras que su aplicación exógena en plantas saludables también resulta en la ramificación de estolones (Palmer & Barker, 1973). A nivel de anatomía foliar se han descrito plantas con hojas más delgadas, pobre diferenciación del mesófilo y tejido vascular débil (Mohamed & Alsadon, 2010) mientras que a nivel celular se describe un proceso de engrosamiento en células parenquimáticas, el cual limita el intercambio gaseoso, lo cual explicaría la presencia de cantidades notables de lenticelas en los cultivos (Bosquez, 2007; Gunderson & Taylor, 1991).

Existen demostraciones de un comportamiento dual del etileno en la tuberización (Vreugdenhil, 1989), como promotor (Catchpole & Huxman, 1969 en Palmer & Barker, 1973) e inhibidor (Hussey & Stacey, 1984; Mingo-Castiel *et al.*, 1974). En cuanto a la actividad promotora, los estudios no indican una participación como responsable directo y algunos investigadores la atribuyen a una modificación endógena de los niveles hormonales más que al efecto directo de etileno; mientras tanto, otros explican su relación con la tuberización gracias a su acción como inhibidor de la elongación celular, evento considerado como requisito previo a la formación de tubérculos (Vreugdenhil, 1989).

Con base en lo anterior, se deduce que la aplicación de diuron a cultivos de *S. tuberosum* produce a través de la formación de etileno, algunos efectos en el desarrollo de la plántula que podrían ser favorables para la inducción de tubérculos, y con base en los resultados de la presente investigación es posible mencionar que a las concentraciones aplicadas el herbicida tampoco inhibe la aparición de los mismos al presentar algunos tubérculos especialmente en presencia de 6% de sacarosa así como engrosamientos puntuales característicos de la secuencia de eventos previos a la aparición de tubérculos visibles; sin embargo estas condiciones no fueron suficientes para lograr

indicar significativamente la tuberización en el tiempo estudiado. Vreugdenhil (1989) sugiere que las discrepancias en los reportes que presentan al etileno como inhibidor o promotor de la tuberización se deben al tiempo de cultivo, por una secuencia en la que la tuberización es un efecto secundario de la inhibición inicial del crecimiento; no obstante Palmer & Barker, 1973) han señalado que los tubérculos formados en presencia de etileno se encuentran desprovistos de almidón, quizás por una excesiva degradación del mismo ó por una baja actividad en las enzimas sintetizadoras, lo cual querría decir que ante la falta de almidón, la planta difícilmente produciría la señal que ordena su acumulación en tejidos localizados, como los tubérculos; siendo esta la razón principal por la que no estén presentes, más que por el periodo de cultivo.

### **Transporte electrónico y pigmentos**

En el caso de la sacarosa 6%, se observa que por sí misma provoca un incremento en la actividad de emisión de fluorescencia entre las fases O, J, I (primordialmente en las dos últimas), no obstante, no existe evidencia de una interrupción del flujo energético y las tasas por centro de reacción indican una disipación reducida (Fig. 30); por tanto, es probable que el incremento registrado en la fluorescencia se deba al importante nivel de reducción en la densidad de centros de reacción activos que resulta en una tasa de actividad fotosintética por área menor (Fig. 38). A pesar ello y del decremento sobre la tasa de absorción, los rendimientos cuánticos demuestran que respecto la cantidad neta de energía absorbida, la energía atrapada y la transferida por centro de reacción son mayores (Fig. 38).

Lo anterior coincide parcialmente con los estudios consultados, y permite hacer algunas observaciones complementarias en lo que respecta al comportamiento fotosintético de *S. tuberosum* frente una fuente abundante de sacarosa en el medio. Estudios previos han propuesto que la acumulación de fotoasimilados en las hojas tiene un papel en la regulación de la tasa fotosintética, y puede ser responsable de una reducción en la tasa neta de fotosíntesis en ellas (Paul & Foyer, 2001; Neales, 1968). Upmeyer & Koller, 1973 apoyan tal idea basados en que sus estudios demostraron que cuando la planta alcanza un nivel de almidón alto y la síntesis del mismo es afectada, un incremento en el nivel de carbohidratos solubles estuvo relacionado con una reducción en la tasa fotosintética.

Hasta este punto es posible establecer una similitud con los resultados obtenidos y explicar la disminución en la tasa fotosintética total en los organismos, pero al continuar con la revisión bibliográfica, es posible encontrar que la investigación de Badr (2011) con *S. tuberosum* (var. Norland) en cultivos *in vitro* sin y con 3% de sacarosa y en un periodo de tiempo equivalente al empleado en la presente investigación, reporta que la presencia de sacarosa impacta en forma negativa y significativa la eficiencia cuántica fotosintética.

Igualmente, Azcón-Bieto, (1983) así como Capellades y colaboradores (1991), mediante estudios en hojas de trigo y cultivos *in vitro* de rosa, observaron una correlación entre la acumulación de carbohidratos y la inhibición fotosintética haciendo énfasis en rendimientos cuánticos reducidos, debido al impacto ejercido por los carbohidratos sobre la producción y consumo de ATP/NAPDH durante la fotosíntesis que causó un deterioro en regeneración del sustrato de carboxilación (RuBP), y a la inhibición de la actividad/síntesis de Rubisco al disminuir el fosfato estromático disponible (Herold, 1980), que a su vez puede restringir las tasas de fotofosforilación y transporte electrónico (Robinson, 1981 en Azcón-Bieto, 1983); se habla también de un impacto sobre las enzimas que participan en el ciclo de Calvin (Tholen *et al.*,2006). Adicionalmente Demo y colaboradores (2008) y Kubota (2001) concuerdan en que los cultivos *in vitro* que carecen de una fuente externa de sacarosa (fotoautótrofos) poseen habilidades fotosintéticas mayores que aquellos con una suplementación de sacarosa; atribuyéndolo a que en general, la escasez carbohidratos aumenta la expresión de genes para la fotosíntesis, movilización de reservas, procesos de exportación, rompimiento de moléculas de almidón (Koch, 1996).

Como es posible notar, en las investigaciones se hace referencia a inhibición fotosintética en función de rendimientos cuánticos y tasas fotosintéticas altamente disminuidas, ante lo cual vale la pena precisar que la investigación en curso demostró que a pesar de haber existido una disminución de la tasa neta de fotosíntesis, no fue debido un impacto negativo sobre los rendimientos y tasas de flujo energético en los centro de reacción del fotosistema II y por ende no es posible referir una inhibición de la capacidad fotosintética. Se sugiere en cambio, referir el impacto de la sacarosa en la fotosíntesis de *S. tuberosum* como la disminución del área foliar fotosintéticamente activa causada por

la inactivación de centros de reacción activos y absorción atenuada; este último evento posiblemente asociado a la conversión de cloroplastos en amiloplastos o cromoplastos, que junto a mecanismos de acumulación a menudo resultan en niveles de almidón elevados (Koch, 1996); todo lo anterior como resultado del mecanismo de autorregulación al que se encuentran sujetos los organismos fotosintéticos para evitar un desbalance en la relación producción-utilización de carbohidratos como respuesta ante la sacarosa abundante y disponible en el medio. También cabe la posibilidad que dichos mecanismos resultasen menos agresivos para el aparato fotosintético en la planta de papa debido a que, como explican Paul & Foyer (2001), cuando existe una alta disponibilidad de asimilados y una incapacidad de establecer nuevas posibilidades de sitios de distribución y utilización (conocidos como "sinks") el resultado es la acumulación de esos asimilados en las propias hojas causando inhibición fotosintética, pero plantas como la papa sufren menos de este mecanismo de retroalimentación entre asimilados y fotosíntesis gracias a su capacidad para incrementar fácilmente el tamaño de estos sitios mediante los tubérculos, el cual puede definirse como un sitio metabólicamente activo creado con la finalidad de movilizar y acumular el almidón sintetizado a partir del sustrato (Palmer & Smith, 1970).

Strain (1971) menciona que las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos mayoritarios en los tejidos verdes de plantas vasculares impartiendo el característico color verde que usualmente obscurece el amarillo y rojo proveniente de los carotenoides que siempre les acompañan, siendo la clorofila *a* el pigmento que otorga a los organismos la capacidad de fotosintetizar y el mayor componente de la coloración verde y en menor medida lo es la clorofila *b*; mientras que la relación de peso clorofila *a/b* es un indicador del equipamiento de pigmento funcional con que cuenta el tejido y la adaptación luminosa del aparato fotosintético (Lichtenthaler *et al.*, 1981 en Lichtenthaler, 2001). En el presente estudio, *S. tuberosum* en cultivos con sacarosa 3% presenta una relación de pigmentos donde clorofila *a* es el pigmento dominante (Fig. 27), seguido por los carotenoides, y en menor proporción la clorofila *b* que dio como resultado una relación *a/b* ligeramente superior a lo esperado considerando que se ha observado que normalmente estos pigmentos ocurren en relación 2:1 a 3:1 en plantas vasculares (Strain, 1971; Lichtenthaler 1987). Algunos ejemplos sugieren que valores altos en la relación *a/b* están asociados al reverdecimiento de hojas etioladas y los menores a hojas maduras

que han alcanzado su desarrollo completo (Lichtenthaler, 2001); con base en lo anterior es posible inferir que la condición de plántula en crecimiento de los cultivos de *S. tuberosum* en la presente investigación tuvo influencia sobre la proporción de clorofilas determinadas; ligado a ello se encuentra el fotoperiodo corto como un condicionante más, pues se sabe que la síntesis de clorofilas en la mayoría de las plantas se encuentra asociada a la acción luminosa y hojas expuestas a la sombra usualmente exhiben valores de relación a/b mayores que las de aquellas plantas expuestas a la luz (Lichtenthaler, 2001; Strain, 1971).

El resultado de pigmentos para sacarosa al 6% (Fig. 27) concuerda con investigaciones previas que mencionan que la adición exógena de sacarosa que no es requerida para el desarrollo normal del aparato fotosintético produce un bajo contenido de clorofila en plantas (Grout & Donkin, 1987 en Mohamed & Alsadon, 2010)

Contrario a lo esperado, destaca que cumarina por sí misma no interrumpió el flujo de energía en algún punto de la medición y por el contrario, disminuyó la energía disipada en forma de fluorescencia en el transcurso de las fases O, J, I (Fig. 29). Dicho compuesto tuvo mayor efecto como reductor de la energía de disipación y secundariamente disminuyó la energía absorbida (Fig. 32), sin embargo, los valores de rendimientos cuánticos indican que hay un incremento en la eficiencia fotoquímica primaria y del flujo de electrónico hasta la cadena transportadora (Fig. 36), de tal forma que, en proporción a la cantidad neta de energía absorbida, la energía atrapada y transportada son mayores con una reducida tasa de disipación. Por otra parte, de acuerdo con la cinética de fluorescencia de la combinación de cumarina con sacarosa al 6% se invirtió totalmente la tendencia de emisión descrita anteriormente, y causó que todos los tratamientos con cumarina indujeran en menor o mayor medida, un nivel de fluorescencia por encima del control con 3% de sacarosa (Fig. 37). Sin embargo, las tasas de flujos específicos y rendimientos reflejan que la presencia de sacarosa abundante no representa una modificación importante en el efecto final de cumarina sobre el fotosistema II (Fig. 34 y 37), hasta que esta última se encuentra presente en alta concentración, pues suprime la reducción en la disipación y atenúa considerablemente los rendimientos de flujo.

Estos datos resultan contrastantes a lo reportado en numerosas investigaciones que describen a compuestos precursores, derivados de cumarina y compuesto fenólicos en general como inhibidores fotosintéticos a nivel de transporte electrónico (Mersie & Singh, 1993; Veiga *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; López, 2013) respecto a éste último estudio en particular, se piensa que la actividad observada sobre el funcionamiento fotosintético es debida a la acción conjunta de sacarosa y cumarina, más que a la cumarina propiamente. Sin embargo también existen, estudios en los que se explica que el comportamiento inhibitor descrito puede invertirse en función de la concentración del compuesto, tal es el caso de Macías y colaboradores (1999) que mediante estudios en cloroplastos aislados de espinaca (*Spinacea olearacea* L.) aseguran que las piranocumarinas xalentina y 3-(1',1'-dimethylallil)-xalentina así como la furanocumarina chalepsina interfieren con el metabolismo fotosintético a distintos niveles, como inhibidores de la reacción de Hill o como inhibidores del transporte electrónico, no obstante, particularmente esta última cumarina (chalepsina) a concentraciones mayores que las requeridas para inhibir el transporte se comporta como desacoplador, siendo capaz de inducir un estímulo del flujo electrónico basal y fosforilante, el cual inhibe la síntesis de ATP a través de la activación de la  $Mg^{2+}$ -ATPasa en la membrana tilacoide.

Respecto a tal comportamiento como estimulante de flujo electrónico, se sabe que los compuestos fenólicos son efectivos donadores de hidrógenos, su potencial antioxidante depende de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural y poseen además la capacidad de soportar su desplazamiento (Bianeth y Restrepo, 2010). Gracias a esta naturaleza, recientemente se ha descrito que las cumarinas, entre el amplio rango de actividad biológica que presentan es posible encontrar la acción fotosensibilizadora de ciertas furanocumarinas (Arango-Acosta, 2010). Esta propiedad es tal, que la cumarina como molécula cromófora ha sido empleada ampliamente a nivel industrial como componente químico de láser colorante, e investigada como sensibilizadora para celdas solares cromo-sensibilizadas con una alta eficiencia en la transferencia energética solar (Mebi *et al.*, 2012; Wong & Cordaro, 2008) y han sido estudiadas como foto-inductores de moléculas biológicas de importancia médica y con fines biotecnológicos como unidades foto-responsivas en polímeros (Maddipatla *et al.*, 2013). Inclusive, dado que en la actualidad uno de los temas que ocupa a la población científica es la creación de sistemas fotosintéticos artificiales por todo lo que su

aplicación implica en el aprovechamiento energético, se ha estudiado la introducción de compuestos "antena" en los sistemas artificiales con finalidad de absorber eficientemente, a través del espectro solar, la luz que es útil para ejecutar las reacciones redox. Uno de estos compuestos es una molécula de cumarina modificada, que ha sido probada en varios modelos de antena, gracias a que dicho cromóforo absorbe en una región del espectro de luz similar a aquella en que absorben los carotenoides en las antenas naturales y transfiere la energía a los centros de reacción artificiales de porfirina con un rendimiento cuántico cercano a 1.0, por lo que se ha concluido que fracciones de cumarina son muy factibles como antenas en un rango de 400 a 460 nm (Garg *et al.*, 2013 y Kaschak *et al.*, 1999).

Adicionalmente en la presente investigación cumarina también probó disminuir la cantidad de pigmentos por debajo de lo observado en el control (Fig. 27), aunque de forma particular, la concentración 102.6  $\mu\text{M}$  mostró una actividad estimulante sobre la producción pigmentaria, especialmente de clorofila *a*. Una concentración de 342.2  $\mu\text{M}$  demostró disminuir principalmente la cantidad de carotenoides presentes alterando la proporción de pigmentos. Esta disminución en carotenoides puede ser evidencia de que cumarina no ejerce un daño oxidativo ni compromete el funcionamiento del fotosistema II, con base en los resultados obtenidos con la emisión fluorescencia, tasas de flujo y rendimientos cuánticos. No obstante, la interacción de cumarina a 102.6  $\mu\text{M}$  con sacarosa al 6% se caracterizó por impactar negativa y mayoritariamente la producción de carotenoides llegando a alterar la proporción esperada, lo cual se atribuye a la participación de la sacarosa más que a un efecto directo ejercido por cumarina. Los aleloquímicos fenólicos han demostrado impactar el contenido de clorofila y la tasa fotosintética (Li *et al.*, 2010), de igual forma se ha señalado que las cumarinas son potentes eliminadoras de cloroplastos mediante cultivos de la microalga *Euglena gracilis* (Krajčovič *et al.*, 1989), y como ya se mencionó decrementos en las clorofilas se encuentran asociados a daño estructural en la membrana que en consecuencia afectan la eficiencia fotoquímica y el transporte electrónico; a pesar de ello, los resultados presentados aquí demuestran que aun ante la pérdida de clorofilas en *S. tuberosum* por la presencia de cumarina, su eficiencia fotoquímica no se vio mermada y por el contrario, resultó estimulada; lo anterior puede atribuirse a que cumarina pudo haber estado directamente involucrada en el flujo energético en las membranas

del tilacoide como un pigmento más y creciente evidencia señala que los compuestos fenólicos (los polifenoles por ejemplo) pueden proteger a las plantas contra el estrés oxidativo.

Nótese que de acuerdo a los rendimientos cuánticos y flujos por área activa de hoja, el efecto de cumarina sobre la actividad fotoquímica y transporte primario es muy semejante al registrado en cultivos adicionados con sacarosa 6% (Fig. 32 y 34 contra 38). Resulta interesante observar que a pesar de que con base en Strasser (2004), la inactivación de centros de reacción activos tendría como consecuencia un incremento en la disipación debido al aumento en la densidad de centros silentes, cumarina y sacarosa provocaron la formación de centros de reacción silentes y al mismo tiempo decreció la energía de disipación; en el caso del compuesto fenólico podría ser el resultado de la propiedad cromófora que canaliza con mayor eficiencia la energía evitando su dispersión en forma de calor (y fluorescencia), pero en cuanto a la sacarosa al 6% no existe certeza sobre la naturaleza del fenómeno. Un escenario que explicaría gran la semejanza entre tratamientos es que la presencia abundante de sacarosa estimula la producción endógena de cumarina y el efecto reflejado en la actividad fotosintética es en sí, de cumarina (más sacarosa).

En coincidencia con investigaciones previas (Taiz & Sieger, 2010), diuron inhibió completamente el flujo energético entre las fases J e I, lo cual, apoyado en las tasas de flujo sugiere una inhibición del flujo electrónico desde quinona hacia la cadena transportadora impidiendo la reoxidación de quinona (Fig. 33), junto con un incremento importante de energía disipada (Fig. 39) a causa de la inactivación de centros de reacción (Fig. 39 y 40) que produce que aquellos activos incrementen el tamaño de la antena y por tanto la absorción por centro activo (Strasser, 2000); los rendimientos cuánticos (Fig. 36) confirman que, en proporción a la cantidad neta de energía absorbida, la energía atrapada es altamente reducida con una tasa de transporte casi nula y una elevada tasa de disipación por encima de la absorción. La combinación de este inhibidor con 6% de sacarosa atenuó considerablemente todos los efectos descritos (Fig. 35); una explicación para este fenómeno puede ser que la adición de azúcares en cultivos *in vitro* estimula el crecimiento de la planta y compensa una baja tasa fotosintética e incrementa las tasas de sobrevivencia (Demo *et al.*, 2008; Kubota *et al.*, 2001)

Respecto a pigmentos, la tendencia de diuron fue disminuir su concentración por debajo de lo observado con el control de sacarosa 3% (Fig 27), manteniendo la proporción observada en el control. A pesar de que la concentración media implicó una recuperación en la producción de pigmentos respecto a lo registrado con 102.6  $\mu\text{M}$ , la concentración 342.2  $\mu\text{M}$  impactó negativamente la producción de clorofila *a* y carotenoides además de mostrar recuperación sobre la clorofila *b*, lo cual alteró la proporción esperada. La evidencia indica que existió interacción con sacarosa al 6% lo cual estimuló la producción de clorofila *b* a 102.6  $\mu\text{M}$  y 171.1  $\mu\text{M}$  e inhibiéndola con 342.2  $\mu\text{M}$ . En casi todos los casos la clorofila *a* fue el pigmento dominante, con excepción de diuron 342.2  $\mu\text{M}$  donde predominó la clorofila *b*. Esto puede considerarse como indicativo de incrementos en el tamaño del sistema antena, ya Lichtenthaler (2001) explica que es exclusiva de las antenas, mientras que la clorofila *a* está presente en el sistema antena y los centros de reacción en ambos fotosistemas. El tamaño del complejo antena en el PSII es variable y demuestra una respuesta adaptativa a la luz, por lo que aquellas plantas adaptadas a la sombra poseen tamaños de antena mucho mayores (por tanto mayores cantidades de clorofila *b*) que las plantas adaptadas al sol, lo cual se ve reflejado consecuentemente en la relación *a/b* como un decremento de su valor (Lichtenthaler, 2001)

kinetina afecta parcialmente la actividad fotosintética desde las primeras fases del incremento de la curva, particularmente parece afectar en mayor medida el flujo de energía en torno de la fase J sin llegar a interrumpir completamente el funcionamiento del fotosistema II (Fig. 29), lo anterior junto con las tasas de flujo calculadas (Fig. 32) sugieren que kinetina ejerció una mayor influencia sobre el flujo de energía de la cadena transportadora disminuyéndolo considerablemente, y a pesar de que incrementó la absorción, disipación y atrapamiento por centro de reacción, los rendimientos cuánticos demuestran que en proporción a la cantidad neta de energía absorbida, la cantidad de energía atrapada es menor y la transportada se ve altamente reducida (Fig. 36), con una tasa de disipación ligeramente mayor que la de absorción. Su efecto sobre los rendimientos incremento sustancialmente con la presencia de sacarosa al 6%. Los estudios disponibles en que se ha estudiado el efecto de kinetina sobre la actividad fotosintética de otras especies coinciden en que la presencia de la hormona en los cultivos tiene como resultado tasas fotosintéticas mayores que en su ausencia (Zerbe & Wild, 1980; Alsokari, 2009; Shah, 2011; Alla *et al.*, 2001) que junto a otros cambios en el metabolismo como incrementos de clorofila señalan que kinetina indujo una fuerte respuesta adaptativa a la luz. (Zerbe &

Wild, 1980). Es probable que la diferencia respecto a estos estudios y la presente investigación se deba a la condición de fotoperiodos largos (16h) en que fueron cultivados los organismos en estos estudios y a las concentraciones superiores.

Contrario a lo que podría esperarse, kinetina disminuyó todos los pigmentos (Fig. 27) manteniendo la proporción mostrada por el control (sacarosa 3%). Investigaciones previas señalan que las citoquininas son moléculas que están envueltas en el metabolismo de las clorofilas (Fletcher & McCullagh, 1971, Lew & Tsuji, 1982, Arnold & Fletcher, 1986 en Anzlovar *et al.*, 1995) y por ello su presencia elevaría los niveles de clorofilas, pero en el presente estudio no fue así. Concentraciones reducidas de clorofilas están a menudo asociadas con daño estructural en la membrana y en consecuencia, niveles de clorofila total bajos afectan la eficiencia fotoquímica. Un decremento en la medición de clorofilas resultó asociado a un decremento en el transporte electrónico (Castro *et al.*, 2011)

#### **Relación clorofila *a/b* y clorofilas/carotenoides**

En general, la aplicación de tratamientos decreció el índice en la relación *a/b* (Fig. 28a). Entre aquellas muestras con cumarina y diuron, únicamente la concentración baja mantuvo una relación clorofila *a/b* en valores considerados saludables, mientras que las concentraciones altas llevaron la relación a los niveles más críticos registrados (diuron en mayor medida que cumarina, y estos dos en mayor grado que kinetina). La presencia de sacarosa abundante por sí misma no impactó de manera importante esta relación (la cual se mantuvo en el nivel esperado), y parece haber exhibido un efecto amortiguador en la variación causada por cumarina y diuron. Los decrementos se encuentran asociados a procesos de maduración, senescencia en los organismos.

Respecto a la proporción de clorofilas/carotenoides (Fig. 28b), índices menores a 4.2 son indicador de senescencia, estrés, así como daño a la planta y su aparato fotosintético expresado por una caída dramática de clorofila en mayor medida que de carotenoides (Lichtenthaler, 2001); con base en dichos criterios es posible establecer que el estrés inducido en *S. tuberosum* por diuron, fue mayor que aquel inducido por cumarina a concentraciones similares, y contrario a los resultados en la

relación *a/b*, se hace más evidente con una fuente externa de sacarosa abundante. Bianeth y Restrepo (2013) mencionan que luteína y zeaxantina (potentes antioxidantes), son los dos carotenoides más abundantes en la papa; y en general los carotenoides poseen dos funciones bien definidas en la fotosíntesis: como pigmentos accesorios en la cosecha de luz y como fotoprotectores contra el daño oxidativo en los centros de reacción, esta última función puede estar relacionada con su propia actividad antioxidante o con una propiedad moduladora de otros antioxidantes celulares; se tiene evidencia también de que el  $\beta$ -caroteno estabiliza el PSII permitiendo la unión correcta entre dicho fotosistema y la proteína D1, conformadora junto con D2, de su centro de reacción, protegiendo a D1 de una rápida degradación. Se ha propuesto que la fitoeno-desaturasa (enzima catalizadora en la biosíntesis de carotenos) es dependiente de la plastoquinona y el estado redox de esta podría limitar la biosíntesis de  $\beta$ -carotenos que a su vez limitaría el ensamble del PSII. Lo anterior podría explicar que las concentraciones de carotenos en los tratamientos con diuron mostraran indicios de recuperación en tal pigmento, ya que consecuentemente este fotosistema podría ajustarse a las condiciones de iluminación mediante una rápida ganancia de  $\beta$ -caroteno, proteína D1 y su correspondiente unión al PSII para favorecer la mitigación de la fotoinhibición y asegurar el funcionamiento del fotosistema II (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Considerando el análisis presentado se propone que la inducción de tubérculos por cumarina pueda originarse bajo el siguiente esquema. Cumarina inicialmente estimula la actividad fotosintética de *S. tuberosum*, sensibilizando la membrana tilacoidea para la absorción y transferencia de energía del sistema antena hacia el centro de reacción, acelerando la tasa de quinonas reducidas por unidad de tiempo y transfiriendo exitosamente esa energía redox a la cadena transportadora; este proceso posiblemente activa el mecanismo endógeno de retroalimentación en la planta, el cual reduce el área fotosintéticamente activa mediante la inactivación de centros de reacción y degradación de clorofilas con la finalidad de evitar una sobrecarga en la producción de fotosintatos y/o desacoplar el flujo energético a causa de la fuerza del estímulo inicial. Esto tiene como consecuencia la disminución en la absorción de energía observada en los flujos específicos y fenomenológicos sin decaer la eficiencia de flujos por lo que la producción de sintatos a través de la vía fotosintética no cesa. Para que dicho mecanismo de retroalimentación sea ejecutado es probable que los niveles endógenos de giberelina

disminuyan lo suficiente para que la relación promotor/inhibidor donde inicialmente el promotor (giberelina) predomina, se invierta en favor del inhibidor, interrumpiendo así el crecimiento longitudinal, foliar, ramificación y estimulando la expansión radial celular; induciendo así un estado de dormancia donde los sintatos que continúan produciéndose vía fotosíntesis y no son destinados al desarrollo vegetativo son movilizados y convertidos a almidón para su almacenamiento mediante la formación de tubérculos. Sobre el origen del estímulo que induce la síntesis de la cumarina presente en la papa es probable que sea la respuesta de *S. tuberosum* ante un factor estresante posiblemente relacionado con el fotoperiodo y/o metabolismo energético.

## CONCLUSIONES

En conclusión, la presente investigación acerca del efecto de inhibidores del transporte electrónico fotosintético en la tuberización de *Solanum tuberosum* var. alpha, presenta evidencia de que:

- Cumarina estimula por sí misma la formación de tubérculos y no inhibe el transporte electrónico; por el contrario, disminuye la disipación de energía y estimula los rendimientos cuánticos durante la fotoquímica primaria.
- La sacarosa en concentración de 6% disminuye el área fotosintéticamente activa mediante la inactivación de centros de reacción, pero no inhibe el rendimiento fotosintético; y no es capaz de inducir tuberización por sí misma, pero puede amplificar el efecto de cumarina sobre la formación de tubérculos.
- Diuron inhibe el flujo de electrones de Quinona hacia la cadena transportadora, y no estimula la formación de tubérculos a pesar de haber originado cambios morfológicos propios de la etapa previa a la aparición de los mismos
- Kinetina afecta el paso de electrones durante la fotosíntesis de manera similar a diuron, y es capaz de estimular la formación de tubérculos por sí sola.
- La interrupción del transporte electrónico no es un evento indispensable o limitante para la inducción del proceso de formación de tubérculos

Finalmente, se sugiere para futuras investigaciones que ante la posibilidad de que el estímulo requerido por *Solanum tuberosum* para iniciar la formación de tubérculos consista en la estimulación de la actividad fotosintética, se estudie el efecto de otros compuestos con acción fotosensibilizadora sobre el proceso de tuberización para confirmar o descartar tal hipótesis.

## AGRADECIMIENTOS

A mí mamá, gracias por hacerme sentir que tu amor y el de mí papá se encuentran siempre presentes conmigo.

Al profesor Juan Gerardo Ortiz por su amable atención, tiempo, conocimiento, espacios y apoyo brindado como director de la presente investigación.

A las profesoras Yolanda Pozos y Ma. del Rocío Reyero por su ayuda en el proceso experimental y por su amabilidad en todo momento durante mi estancia en el laboratorio

A la profesora Antonia Trujillo, así como los profesores Marcial García y Manuel Mandujano, por el tiempo empleado para la revisión del presente escrito y por sus observaciones y sugerencias.

A Marysol Morales, Mónica Nicolás, Angel Caballero, Brenda Magaly, gracias por su amistad. Su compañía, pláticas, peleas, sonrisas y apoyo convirtieron la universidad en una experiencia completa y única de la cual conservo con mucho cariño recuerdos muy valiosos. Llevo siempre conmigo lo mejor de ustedes. Los quiero.

*“ Si el mundo fuera plano quizás no nos habríamos conocido,  
estábamos corriendo sin detenernos, lejos uno del otro.  
Así, no importa lo lejos que estemos ahora,  
seguramente nos volveremos a encontrar, en este ciclo infinito ”*

- Maaya Sakamoto  
(Loop, 2005)

## REFERENCIAS

- Aldabe L. & Dogliotti S. 2011. Bases fisiológicas del crecimiento y desarrollo del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Curso Fisiología de los Cultivos. Universidad de la República de Uruguay. p. 5 -6
- Alla N.M.M., Younis M.E., El-shihaby O.A. & El-Bastawisy Z.M. 2001. Effect of kinetin on photosynthetic activity and carbohydrate content in waterlogged or seawater treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *Online Journal of Biological Sciences*. 1(10): 918-924.
- Alsokari S.S. 2009. Modulatory role of kinetin on photosynthetic characteristics, yield and yield attributes of cadmium-treated sorghum bicolor plants. *Journal of Applied Sciences Research*. 5(12):2383
- Anzlovar A., Kovac M. & Ravnikar M. 1996. Photosynthetic pigments in healthy and virus-infected potato plantlets (*Solanum tuberosum* L.) grown *in vitro*. *Phyton Annales rei Botanicae*. 36(2):221-230
- Arango A.G.J. 2010. Compuestos derivados del ácido shikímico. Introducción al metabolismo secundario. Universidad de Antioquia - Facultad de Química Farmacéutica. Colombia. p. 34-41
- Audus L.J. 1954 Studies on the phytostatic action of 2:4-Diclorofenoxyacetic acid and coumarina, the reversibility of root-growth inhibitions. *New phytologist*. 47:196-220
- Azcón-Bieto J. 1983. Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology*. 73:681-686
- Badr A., 2011. *In vitro* and *ex vitro* potato plantlets (*Solanum tuberosum*) metabolic response to exogenously supplied sucrose: a metabolic approach. Tesis de doctorado (Biología vegetal). Universidad Laval - Facultad de ciencias de la agricultura y la alimentación. Quebec. 162 p.
- Bianeth P.C. & Restrepo L.P. 2013. Compuestos fenólicos y carotenoides en la papa: revisión. *Nutrición*. 14(1):25-32
- Bosquez M.E. 2007. Reguladores del crecimiento. [Internet]. Universidad Autónoma de Metropolitana. México. [Citado 2014 Septiembre 22]. Disponible desde: [http://docencia.izt.uam.mx/elbm/233248/material\\_adicional/regscrecim.pdf](http://docencia.izt.uam.mx/elbm/233248/material_adicional/regscrecim.pdf)
- Bougard F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S. & Materns U. 2006. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unraveled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*. 5:293-308
- Capellades M., Lemeur R. & Debergh P. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 25:21-26
- Castro A.F., Campostrini E., Torres N.A. & Hespanhol V.L. 2011. Relationship between photochemical efficiency (JIP-test parameters) and portable chlorophyll meter readings in papaya plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 23(4): 295-304
- CIP. 2012. Potato. [Internet]. Centro Internacional de la Papa. [Citado 2013 Diciembre 19]. Disponible desde: <http://cipotato.org>
- CIP. 2013. Wild potato species. [Internet]. [Citado 2013 Diciembre 23]. Disponible desde: [https://research.cip.cgiar.org/genebankdb/modules/wpsa\\_old/http://cipotato.org/potato/wild-species](https://research.cip.cgiar.org/genebankdb/modules/wpsa_old/http://cipotato.org/potato/wild-species)

- Curtis H., Barnes, Schnek A. y Massarini A. 2008. Biología. 7a ed. Ed. Panamericana. España. p. 136-148
- Delgado-Vargas F., Jiménez A.R. & Paredes-López O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(3):173-289.
- Demo P., Kuria P., Nyende A.B. & Kahangi E.M. 2008. Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology*. 7(15):2578-2584.
- Dieme A., Sagna M. & Sy M.O. 2001. Influence of hormonal treatments and of sucrose on the microtuberization of three potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) adapted to agroclimatic conditions in Senegal. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 1(3):69-77
- FAO, 2013. FAOSTAT. [Internet]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Citado 2013 Diciembre 24]. Disponible desde: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fernie A. R. & Willmitzer L., 2001. Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development. *Plant Physiology* 127:1459-1465
- Garg G.K.V., Lidell P.A., Terazono Y., Moore T.A., Moore A.L. & Gust D. 2013. Artificial photosynthetic reaction center with a coumarina-based antenna system. *The Journal of Physical Chemistry B*. 117:11299-11308
- González M.S., Perales V.H. y Salcedo A.M.O. 2008. La fluorescencia de la Clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista Educación Bioquímica*. 27(4):119-129
- Gracia C.A. 2010. Ecología Forestal: Estructura, funcionamiento y producción de las masas forestales. Universidad de Barcelona. España. p. 95-131
- Grodzinski B., Boesel I., & Horton R.F. 1981. Ethylene release from leaves of *Xanthium strumarium* L. and *Zea mays* L. *Journal of Experimental Botany*. 33(133):344-354.
- Gunderson C.A. & Taylor G.E. Jr. 1991. Ethylene directly inhibits foliar gas exchange in *Glycine max*. *Plant Physiology* 95:337-339
- Gutiérrez M.C., Parry A., Tena M., Jorin J. & Edwards R. 1995. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry*. 38(5):1185-1191
- Herold A. 1980. Regulation of photosynthesis by sink activity – the missing link. *New Phytologist*. 86:131-144
- Housley S. & Taylor C. 1958. Studies on Plant-Growth Hormones VI. The nature of the inhibitor- $\beta$  in potato. *Journal of Experimental Botany*. 9(3):458-471.
- Hussey G. & Stacey N.J., 1981. *In vitro* Propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany Company*. 48:787-796.
- Hussey G. & Stacey N.J., 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany Company*. 53:565-574.
- INEGI. 2012. El sector alimentario en México. [Internet]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [Citado 2013 Diciembre 18]. Disponible desde: [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2012/sam2012.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2012/sam2012.pdf)
- Jackson S.D., 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology*. 119:1-8

- Kaschak D.M., Johnson S.A., Waraksa C.C., Pogue J. & Mallouk T.E. 1999. Artificial photosynthesis in lamellar assemblies of metal poly(pyridyl) complexes and metalloporphyrins. *Coordination Chemistry Reviews*. 185-186:403-416
- Kew. 2013. *Solanum tuberosum* (potato). [Internet]. Royal Botanic Gardens. [Citado 2013 Diciembre 14]. Disponible desde: <http://www.kew.org/plants-fungi/Solanum-tuberosum.htm>
- Koch K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:509-40
- Kooman P. L. 1995. Yielding ability of potato crops as influenced by temperature and daylength. Tesis de Doctorado. Universidad de Agricultura de Wageningen. Países Bajos. p. 35-73
- Krajčovič J., Ebringer L. & Polónyi J. 1989. Quinolones and coumarins eliminate chloroplast from *Euglena gracilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(11):1883-1889
- Kubota C., Kakizaki N., Kozai T., Kasahara K., & Nemoto J. 2001. Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. *HortScience*. 36(1):49-52
- Li Z.H., Wang Q., Ruan X., Pan C.D. & Jiang D.A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*. 15:8933-8952.
- Lichtenthaler H.K. & Buschmann C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy, En: Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D.M. & Sporns P (eds.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Ed. John Wiley & Sons. Alemania. Suplemento F4.3.1-F4.3.8
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148:350-382
- López C.M. 2013. Efecto de la cumarina 1,2-Benzopirona en el crecimiento de papa *Solanum tuberosum* var. Tollocan *in vitro*. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México - Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 52 p.
- Macías M. L., Rojas I.S., Mata R., & Lotina-Hennsen B. 1999. Effect of selected Coumarins on spinach chloroplast photosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:2137-2140
- Maddipatla M.V.S.N., Wehrung D., Tang C., Fan W., Oyewumi M.O., Miyoshi T. & Joy A. 2013. Photoresponsive coumarin polyesters that exhibit cross-linking and chain scission properties. *Macromolecules*. 46:5133-5140.
- Mader S. S. 2010. *Biology*. 10a ed. Ed. McGraw Hill. E.U.A. p. 117-124
- Martínez-García J.F, García-Martínez J.L., Bou J. & Prat S. 2002. The interaction of gibberellins and photoperiod in the control of potato tuberization. *Journal of Plant Growth Regulation*. 20:377-386.
- Mebi C.A., Joshua J.T. & Bhuiyan A.A. 2012. Diironcarbonyl-coumarin complex:preparation, intramolecular electron transfer, and electro-generation of hydrogen. *Central European Journal of Chemistry*. 10(4):1218-1222
- Mersie W., & Singh M. 1993. Phenolic acids affect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cells of velvet-leaf. *Journal of Chemical Ecology*. 19(7):1293-1301
- Mingo-Castiel A.M., Negm F.B., & Smith O.E. 1974. Effect of carbon dioxide and ethylene on tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiology*. 53:789-801

- Mohamed M.A.H. & Alsadon A.A., 2010. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Scientia Horticulturae*. 123:295-300
- Neales T.F. & Incoll L.D. 1968. The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in the leaf: a review of the hypothesis. *The Botanical Review*. 34(2):107-125
- Neumann J. 1959. An Auxin-like Action of Coumarin. *Science*. 129:1675-1676
- Okazawa Y. 1967. Physiological studies on the tuberization of potato plants. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*. 55(3): 267-336
- Palmer C.E. & Barker W.G. 1973. Influence of ethylene and kinetin on tuberization and enzyme activity in *Solanum tuberosum* L. stolons cultured *in vitro*. *Annals of Botany*. 37:85-93
- Palmer C.E. & Smith O.E. 1969. Effect of abscisic acid on elongation and kinetin-induced tuberization of isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant & Cell Physiology*. 10:657-664
- Palmer C.E. & Smith O.E. 1970. Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant & Cell Physiology*. 11:303-314
- Paul M.J. & Foyer C.H., 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1383-1400
- Paupardin C., & Tizio R. 1970. Action de quelques composés phénoliques sur la tubérisation de la Pomme de terre. *Potato Research*. 13(3) : 187-198
- Pérez-López D.J., Vázquez-García L.M., Sahagún-Castellanos J. & Rivera-Peña A. 2007. Variabilidad y caracterización de diez variedades de papa en tres localidades del Estado de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 13(1): 13-19.
- Raven P.H., Johnson G.B., Mason K.A., Losos J.B., y Singer S.R. 2011. *Biology*. 9a ed. Ed. McGraw Hill. E.U.A. p. 147-158
- Rubio C.O.A., Rangel G.J.A., Flores L.R., Magallanes G.J.V., Díaz H.C., Zavala Q.T.E., Rivera P.A., Cadena H.M., Rocha R.R., Ortiz T.C., López D.H., Díaz V.M. & Paredes T.A. 2000. Manual para la Producción de Papa en las Sierras y Valles Altos del Centro de México. INIFAP. México. Libro Técnico No. 1. 67 p.
- SAGARPA, 2010. El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). [Internet]. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. [Citado 2013 Diciembre 17]. Disponible desde: [http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/boletinDetalle.php?from=0&accion=buscar&subrutina=pagina\\_1&column=2&busqueda=&orderBy=Boletines.Fecha&order=ASC&fecha=&boletinId=3707443714b7c25fbb51b9](http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/boletinDetalle.php?from=0&accion=buscar&subrutina=pagina_1&column=2&busqueda=&orderBy=Boletines.Fecha&order=ASC&fecha=&boletinId=3707443714b7c25fbb51b9)
- Shah S.H. 2011. Kinetin improves photosynthetic and antioxidant responses of *Nigella sativa* to counteract salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*. 58(3):454-459
- SIACON. 2013. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. [Internet]. SAGARPA-SIAP. México. [Citado 2013 Diciembre 17]. Disponible desde: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=181&Itemid=426](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=181&Itemid=426)
- Solarte M.E., Moreno L., Melgarejo M.L. 2010. Fotosíntesis y pigmentos vegetales. En: Melgarejo L.M., Hernández S., Barrera J., Solarte M.E., Suárez D., Pérez L.V., Rojas Y.A., Cruz A.M., Moreno-Álvarez L.G., Crespo S. y Pérez W (eds.). Experimentos en Fisiología vegetal. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. p. 107-122
- Stallknecht G.F. & Farnsworth S. 1982. General characteristics of coumarin-induced

- tuberization of axillary shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *American Potato Journal*. 59:17-32
- Stallknecht G.F. 1972. Coumarin-induced tuber formation on excised shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant physiology*. 50:412-413.
- Strain H. H., Cope. B. T. & Svec. W. A. 1971. Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. *Methods in Enzymology*. (23):452-476
- Strasser R. J., Srivastava A. & Tsimilli-Michael M. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En: Yunus M., Pathre U., Mohanty P. (eds.). *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, Ed. Taylor and Francis. Reino Unido. p. 443–480
- Strasser R. J., Tsimilli-Michael M. & Srivastava A. 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. En: Govindjee, Sharkey & Thomas D. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Ed. Springer. Vol. 19. P. 321-362
- Taiz L. & Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*. 5a ed. Ed. Sinauer. E.U.A. p: 111-144
- Tapia M. E. & Frías A. M., 2007. Agronomía de los cultivos andinos. En: Guía de Campo de los cultivos Andinos. Capítulo IV. FAO. p. 24-42.
- The Plant List. 2010. *Solanum tuberosum*. [Internet]. Royal Botanic Gardens, Kew & Missouri Botanical Garden. [Citado 2013 Diciembre 14]. Disponible desde: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/tro-29600334>
- Tholen D., Poorter H. & Voeselek L.A.C.J. 2006. Ethylene and plant growth. En: Khan N. A. (ed.). *Ethylene Action in plants*. Ed. Springer. Alemania. p. 41-43
- Tissut M., Chevallier D. & Douce R. 1980. Effet de différents polyphénols sur les mitochondries et les chloroplastes isolés. *Phytochemistry*. 19(4):495-500.
- Tovar P., Estrada R., Schilde-Rentschler L., Dodds J.H. 1985. Induction and use of *in vitro* potato tubers. CIP Circular, International Potato Center. 13: 1-4.
- Tropicos. 2013. *Solanum tuberosum* L. [Internet]. Missouri Botanical Garden. [Citado 2013 Diciembre 13]. Disponible desde: <http://www.tropicos.org/Name/29600334>
- Upmeyer D.J. & Koller H.R. 1973. Diurnal trends in net photosynthetic rate and carbohydrate levels of soybean leaves. *Plant Physiology*. 51:871-874
- USBP. 2011. *Potato nutrition handbook*. [Internet]. United States Potato Board. USA. p. 2. [Citado 2013 Septiembre 7]. Disponible desde: <http://www.potatogoodness.com/>
- Vázquez Carrillo M. G., Rubio Covarrubias O. Á., Salinas Moreno Y. & Santiago Ramos D. Usos alternativos de la papa en el Estado de México. SAGARPA-INIFAP. 2012. p. 14-24.
- Veiga T.A.M., González-Vázquez R., Oiano N.J., Silvia M.F.G.F., King-Díaz B. & Lotina-Hennsen B. 2007. Siderin from *Toona ciliata* (Meliaceae) as photosystem II inhibitor on spinach thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 465:38-43
- Vreugdenhil D. & Van-Dijk W. 1989. Effects of ethylene on the tuberization of potato (*Solanum tuberosum*) cuttings. *Plant Growth Regulation*. 8:31-39
- Wong B.M. & Cordaro J.G. 2008. Coumarin dyes for dye-sensitized solar cells: A long-range-corrected density functional study. *The Journal of Chemical Physics*. 129: 214703(1) – 214703(8)

Zerbe R. & Wild A. 1980. The effect of kinetin on the photosynthetic apparatus of *Sinapis alba*. *Photosynthesis Research*. 1:53-64

[wien.ac.at/Seiten-Arten/Solanum-tuberosum.htm](http://wien.ac.at/Seiten-Arten/Solanum-tuberosum.htm)

Zuloaga F., Contreras P. A., Cádiz R. F., Olivares M. K. 1999. [Internet]. Pontificia Universidad Católica de Chile. Estructura

### **Fotografías e ilustraciones**

Baldonado P. 2005. [Internet]. Biología 2o Bachillerato. Metabolismo. [Consultado 2014 Agosto 24]. Disponible desde: [http://images.slideplayer.es/2/315461/slides/slide\\_47.jpg](http://images.slideplayer.es/2/315461/slides/slide_47.jpg)

de la materia. [Consultado 2014 Agosto 24]. Disponible desde: [http://www7.uc.cl/sw\\_educ/qda1106/CAP2/2B/2B1/Imagenes/d07.gif](http://www7.uc.cl/sw_educ/qda1106/CAP2/2B/2B1/Imagenes/d07.gif)

CIP, 2013. [Internet]. Wild potato species atlas. [Consultado 2013 Diciembre 21]. Disponible desde: [https://research.cip.cgiar.org/genebankdb/modules/wpsa\\_old/](https://research.cip.cgiar.org/genebankdb/modules/wpsa_old/)

Fontanella F. [Internet]. Meditflora [Consultado 2013 Diciembre 20]. Disponible desde: [http://www.meditflora.com/flora/solanum\\_tuberosum.htm](http://www.meditflora.com/flora/solanum_tuberosum.htm)

Fueyo O.M.A. 2007. Las nuevas tendencias de calidad en la producción de patata. [Internet]. Tecnología Agroalimentaria - Boletín informativo del SERIDA. España. [Consultado 2013 Septiembre 7]. 5:50-54. Disponible desde: <http://www.serida.org/boletin.php>

Martínez-Sierra B. 2013. [Internet]. Fotosíntesis. Universidad de El Salvador. p. 4. [Consultado 2014 Agosto 24]. Disponible desde: [http://www.agronomia.ues.edu.sv/materias/FOTOSINTESIS\\_Y\\_SISTEMAS\\_FOTOSINTETICOS.pdf](http://www.agronomia.ues.edu.sv/materias/FOTOSINTESIS_Y_SISTEMAS_FOTOSINTETICOS.pdf)

McRobb A. [Internet]. KEW. [Consultado 2013 Diciembre 20]. Disponible desde: <http://www.kew.org/plants-fungi/Solanum-tuberosum.htm>

Mrkvicka A. 2008. [Internet]. Das Naturhistorische Museum Wien. [Consultado 2013 Diciembre 20]. Disponible desde: <http://flora.nhm->

## ANEXO I

### Cultivo de la papa en México

Las características mencionadas convierten a la papa en un recurso de gran demanda en México y muchos otros países (SAGARPA, 2010). Algunos datos sobre el cultivo de papa nacional, la producción total y el valor en el mercado a lo largo de más de 30 años (1980-2011) parecen indicar una situación particular. Respecto al cultivo, la superficie dedicada a la siembra desde los 80's hasta el 2011 ha sido en promedio mayor a las 68,000 Ha, sin embargo se observa una ligera tendencia al decremento en el cultivo y se registran fluctuaciones importantes a lo largo de estos años, algunas de ellas superando en más de 20% al promedio anual con un total de 82,600 Ha para 1990, mientras que en 2009 la cifra disminuyó en 21% con 54,100 Ha de superficie sembrada. (Fig. 6). Cabe destacar en que la mayoría de los años la superficie cosechada respecto a la siembra inicial, ha sido cercana al 100% con un promedio de pérdidas de 2,500 Ha cada año, con excepción del 2011, año que registra la mayor pérdida de cultivo en 30 años con más de 14,000 Ha menos, esto último puede deberse a la marcada sequía que se presentó a finales de este año.

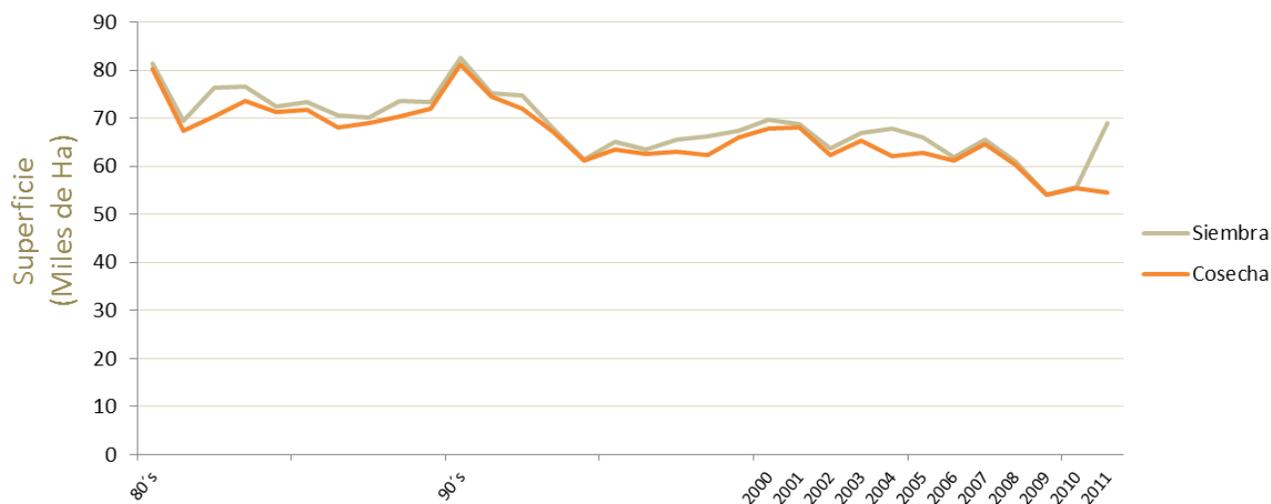


Figura 6.- Hectáreas de papa sembradas y cosechadas en México entre los años 1980 y 2011. (Fuente: Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta SIACON de la SAGARPA, 2013).

A pesar de que han ido disminuyendo las hectáreas de siembra de papa, las cifras respecto a las toneladas de papa producidas contrastan con este hecho pues existe una tendencia hacia la alta aunque con fluctuaciones (Fig. 7). En promedio se producen 1.2 millones de toneladas en el país, y el máximo histórico para este tiempo ha sido de poco más de 1.7 millones de papas producidas durante el 2009.

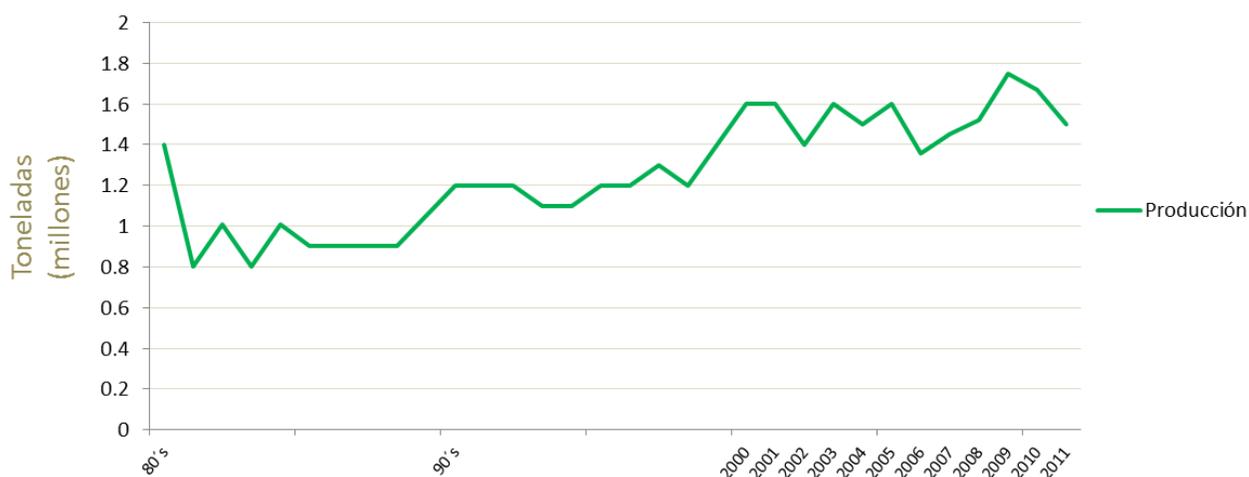


Figura 7.- Toneladas de papa cosechadas en México entre los años 1980 y 2011.  
(Fuente: Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta SIACON de la SAGARPA, 2013).

El contraste entre la producción y la superficie se debe a que a lo largo del tiempo el cultivo se ha ido eficientando y las toneladas producidas por hectárea han sido mayores, pasando de 17.4 t/Ha en 1980 a las 27.5 t/Ha registradas en 2011. Finalmente las cifras sobre el valor de la producción hablan de una gran tendencia al incremento de su valor cada año. Hace alrededor de 30 años, el valor de la producción se colocaba en poco más de 5 millones de pesos, en la actualidad su valor se ha multiplicado hasta los más de 9 mil millones. El año con mayor valor de la producción fue en 2009 y 2010 con 11.3 y 11.6 miles de millones de pesos (Fig. 8).

### Cultivo de papa a nivel Internacional

Debido a las características de la papa y a su adaptación a diversos climas y sistemas de cultivo, la producción mundial de papa va en aumento, especialmente en los países más poblados como China e India. De acuerdo con cifras de la FAO, en 2011 la producción de papa estuvo encabezada por China (Fig. 9), quienes tienen una producción alrededor de 59 veces mayor respecto

a México con poco más de 88 millones de toneladas de papa en el año, seguida por India y la Federación Rusa con 42 y 32 millones respectivamente.

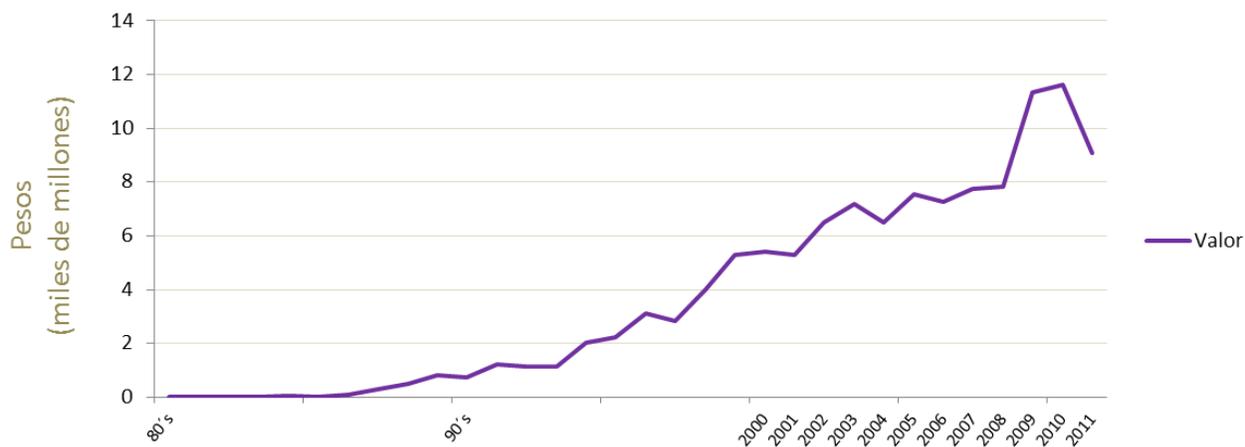


Figura 8.- Cifras sobre el valor de la papa producida en México entre los años 1980 y 2011. (Fuente: Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta SIACON de la SAGARPA, 2013).

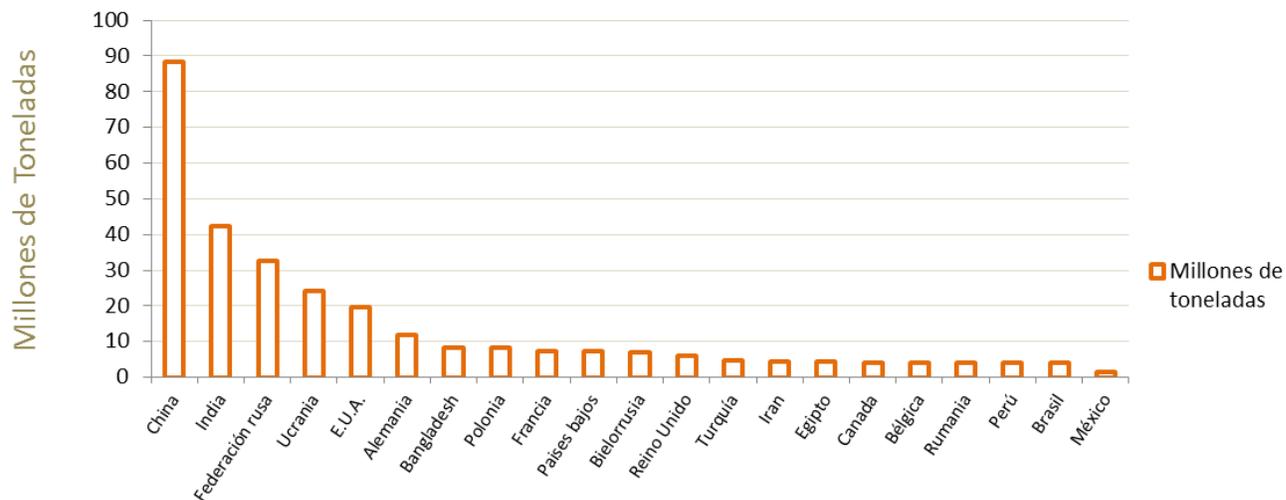


Figura 9.- Millones de toneladas de papa generadas en 2011 por los 20 principales países productores y la posición de México respecto a ellos. (Fuente: FAO, 2013).

## ANEXO II

### Medios de cultivo

Los medios corresponden a variaciones del original Murashige & Skoog de 1962, de acuerdo a Tovar *et al.* (1985) y Palmer & Smith (1969).

Medio C			
<b>Sales MS: Elementos mayores y menores</b>	Solución A	100	mL
	Solución B	10	mL
	Solución C	10	mL
<b>Factor de crecimiento</b>	Inositol	200	mg
<b>Vitamina</b>	Tiamina	0.4	mg
<b>Fuente de energía</b>	Sacarosa	30	g
<b>Soporte</b>	Agar	8	g

Medio S			
<b>Sales MS: Elementos mayores y menores</b>	Solución A	100	mL
	Solución B	10	mL
	Solución C	10	mL
<b>Factor de crecimiento</b>	Inositol	200	mg
<b>Vitamina</b>	Tiamina	0.4	mg
<b>Fuente de energía</b>	Sacarosa	60	g
<b>Soporte</b>	Agar	8	g

Todas las cantidades descritas corresponden a 1000mL de medio de cultivo. Una vez colocadas las cantidades y aforado el medio se ajustó el pH a 5.7, y se esterilizó a 120°C y 15 libras de presión durante 15 minutos y se colocaron aproximadamente 20mL por explante.

### Tratamientos

Para poder adicionar a los medios la kinetina, cumarina y diuron fueron preparadas soluciones concentradas con los reactivos disueltos en solución acuosa de etanol (5 – 10% de etanol)

### Cuantificación de Clorofilas y carotenoides

La cuantificación se llevó a cabo por tratamiento. Se seleccionaron muestras al azar, se retiraron raíces y se tomó la totalidad del material restante para la cuantificación (tallos, tubérculos, ramas y hojas). Dicho material fue cortado en trozos y pesado para obtener y registrar su "peso fresco" e inmediatamente colocado en un mortero sobre agua con hielo y tapado de la luz (con la finalidad de evitar la degradación de las clorofilas) para homogenizar con acetona al 80%. La mezcla fue colocada en tubos de microcentrífuga de 1.5mL los cuales se centrifugaron a 10,000rpm durante 5 minutos para separar las clorofilas del resto de material celular. Se repitió la centrifugación según fuera requerido hasta que las pastillas perdieran el color verde. Las pastillas fueron desechadas y los sobrenadantes unidos nuevamente en una probeta (fría y cubierta de la luz) y aforados con acetona al 80% a la unidad inmediata más próxima y se registró el volumen. El espectrofotómetro se calibró con acetona al 80% como blanco. Una muestra del sobrenadante aforado fue colocada en cubeta de 3mL para registrar la absorbancia a 663, 646 y 470nm. Se calcularon las concentraciones de los pigmentos de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Lichtenthaler & Buschmann, 2001):

<b>Clorofila a</b>	<b>Clorofila b</b>
$(12.21 \times A_{663}) - (2.81 \times A_{646})$	$(20.13 \times A_{646}) - (5.03 \times A_{663})$
<b>Carotenoides</b>	
$\frac{(1000 \times A_{646}) - (3.27 \times \text{Clorofila a}) - (104 \times \text{Clorofila b})}{198}$	

Los valores obtenidos con las ecuaciones corresponden a la concentración de pigmentos expresada como  $\mu\text{g}$  por mL de muestra en la cubeta, por lo que se requiere ajustar el resultado al volumen del extracto multiplicándolo por dicho valor y por último dividiendo entre el peso fresco del material inicial para obtener la concentración total de clorofila expresada como  $\mu\text{g}$  por gramo de tejido fresco.