



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Efecto de cinetina sobre la fotosíntesis y tuberización *in vitro* de
Solanum tuberosum L. var. alpha a distintas concentraciones de
almidón en planta y su crecimiento en dos medios de cultivo líquido.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

CAMACHO MONTIEL SERGIO

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



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Nada grande se crea de repente.

Anónimo.

El momento más espantoso es siempre justo antes de empezar.

S. King

Dedicatoria.

A mis padres por apoyarme en todo momento, sin ustedes hubiera sido imposible concluir este proyecto, gracias por estar siempre presentes y brindarme lo necesario para continuar, por ser siempre un ejemplo a seguir y mostrarme que es importante ser constante, este logro es para ustedes.

Agradecimientos.

Al Dr. Gerardo Ortiz Montiel por brindarme en todo momento su apoyo y aliento para llevar a término este trabajo. Muchas gracias por compartir su conocimiento, se le estima mucho.

A mis sinodales por sus acertadas correcciones y contribuir al mejoramiento de este trabajo.

A mi novia y familia que siempre me han alentado a continuar, me han brindado su amor y confianza, pero sobre todo que han estado presentes en todos mis proyectos.

A mi abuelo que ha sido siempre un gran ejemplo y me ha mostrado el amor y respeto por la vida.

A mis amigos y compañeros con los cuales he aprendido grandes cosas y claro, por brindar siempre una sonrisa.

Índice.

Índice de figuras	6
Abreviaturas	7
Resumen	9
1. Introducción	10
1.1.Características y cultivo de papa.....	10
1.2 Formación del tubérculo	11
1.3 Citocininas	12
1.4 Cinetina (6-furfurilamino purina).....	14
1.5 Fotosíntesis y Fotosistema II.	15
1.6 Cadena de transporte electrónico.	16
1.7 Fluorescencia.....	17
1.8 Cultivo in vitro y medios de cultivo.....	20
2. Hipótesis	22
3. Objetivos	22
4. Material y Método	24
4.1 Material vegetal	24
4.2 Aclimatación.....	24
4.3 Acumulación de almidón.....	24
4.4 Aplicación de tratamientos.	25
4.5 Medición y Manejo de resultados.....	25
5. Resultados	28
5.1 Crecimiento y Formación de los tubérculos.....	28
5.2 Cuantificación de almidón en hoja.....	32
5.3 Cuantificación de clorofila “a” y “b” en hoja.....	35
5.4 Inducción de fluorescencia de clorofila a (fase rápida OJIP).....	40
5.5 Flujos específicos por centro de reacción y eficiencias cuánticas.	45
6. Discusión	49
6.1 Formación de los tubérculos	49

6.2	Peso fresco.	49
6.3	Cuantificación de almidón en hoja.....	50
6.4	Cuantificación de clorofila “a” y “b” en hoja.....	52
6.5	Inducción de fluorescencia de clorofila a (fase rápida OJIP).....	53
6.6	Flujos específicos por centro de reacción y eficiencias cuánticas.....	55
7.	Conclusiones.	57
8.	Referencias.	58

Índice de figuras

Figura 1. Conformación estructural y similitudes entre adenina y cinetina.	14
Figura 2. Esquema en z de la fotosíntesis.....	16
Figura 3. Transferencia de protones y electrones.	17
Figura 4. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	18
Figura 5. Comparación de cultivo <i>in vitro</i> de <i>S. tuberosum</i>	28
Figura 6. Microtuberculos de <i>S. tuberosum</i> en medio de cultivo MS.....	29
Figura 7. Microtuberculos de <i>S. tuberosum</i> en medio de cultivo HG.....	29
Figura 8. Comparacion de peso fresco en plantas de <i>S. tuberosum</i>	31
Figura 9. Cuantificación de almidón en hoja.....	33
Figura 10. Cuantificación de <i>Clorofila a</i>	36
Figura 11. Relación de <i>Clorofila a/b</i>	39
Figura 12. Cuantificación de <i>Clorofila b</i> en hoja.	38
Figura 13. Comportamiento del PSII de <i>S. tuberosum</i> en el día 0.....	42
Figura 14. Comportamiento del PSII de <i>S. tuberosum</i> en el día 6.....	43
Figura 15. Comportamiento del PSII de <i>S. tuberosum</i> en el día 10.....	44
Figura 16. Flujos específicos y eficiencias cuánticas al día 0.....	45
Figura 17. Flujos específicos y eficiencias cuánticas al día 6.....	46
Figura 18. Flujos específicos y eficiencias cuánticas al día 10.....	47

Abreviaturas

ABS/CR: Absorción por centro de reacción.

Cl_a: Clorofila *a*.

Cl_b: Clorofila *b*.

Dio/CR: Disipación a tiempo 0 por centro de reacción.

ETo/CR: Transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción.

Fo: Fluorescencia mínima.

Fm: fluorescencia máxima.

HG: Medio de cultivo Hoagland.

HG+C: Medio de cultivo Hoagland adicionado con 3 mg/L de Cinetina.

HG+C+S: Medio de cultivo Hoagland adicionado con 3 mg/L de Cinetina y 30% de sacarosa.

I: Reducción parcial de Q_B.

J: Reducción parcial de Q_A.

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog.

MS+C: Medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con 3 mg/L de Cinetina.

MS+C+S: Medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con 3 mg/L de Cinetina y 30% de sacarosa.

O: Fluorescencia mínima (**Fo**).

OJIP: Curva de inducción de fluorescencia de clorofila *a*.

P: Fluorescencia máxima (**Fm**).

PQ: Plastoquinona.

PSI: Fotosistema I.

PSII: Fotosistema II.

Q_A: Quinona A.

Q_B: Quinona B.

TRo/CR: Atrapamiento a tiempo 0 por centro de reacción.

Φ_{Po}: Producto cuántico de la fotoquímica primaria.

Ψ_0 : Eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q_A^- .

Φ_{E0} : Probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- .

Resumen.

La papa (*Solanum tuberosum*) es el séptimo cultivo más importante de México y considerado como un alimento básico para la población debido a su valor nutrimental. Sin embargo, el proceso de tuberización no se conoce completamente, por lo que el estudio de las hormonas implicadas para la formación del tubérculo resultan de gran importancia, en especial la cinetina como inductor en la tuberización en conjunto con la sacarosa y el fotoperiodo que recibe la planta, además de evaluar alternativas viables de cultivo *in vitro* en esta planta. En el presente estudio se evaluó mediante fluorescencia de la clorofila *a* el efecto de la cinetina y fotoperiodo, sobre la fotosíntesis y tuberización *in vitro*, además de la acumulación de almidón en plantas de *Solanum tuberosum* L. var. alpha en dos medios de cultivo líquido distintos. Se observó que el crecimiento de *S. tuberosum* en fotoperiodo de 8 h/luz indujo una mayor acumulación de almidón en hoja. Además se observó que este fotoperiodo promovió la formación del tubérculo a los 8 días posteriores a la aplicación de la hormona. En contraste el fotoperiodo de 16 h/luz indujo menos almidón acumulado y la tuberización ocurrió diez días después del tratamiento. A diferencia de cinetina, la presencia de sacarosa en el medio no es determinante para que ocurra la tuberización en papa var. alpha. Por otro lado, se observó que la aplicación de 3 mg/l de cinetina, provoca la inhibición de la eficiencia fotosintética en la planta, previo a la tuberización, sin embargo estimula la eficiencia fotosintética cuando cuando se inicia la formación del tubérculo. Finalmente se encontró que La utilización de la solución nutritiva Hoagland resulta igual de eficiente que el medio MS líquido para el cultivo *in vitro* de papa y en ambos casos se promueve el correcto desarrollo de hojas.

1. Introducción.

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los más importantes a nivel mundial, tan solo en México se posiciona como el séptimo más importante del país alcanzando un valor anual de 11 mil mdp con producciones de entre 1.7 y 1.8 millones de toneladas al año (SHCP, 2014), por lo que representa uno de los tubérculos con mayor presencia dentro de la dieta y economía de la población resultando de gran interés el estudio de los factores asociados a la formación de los tubérculos (tuberización).

El consumo del tubérculo de papa genera una demanda constante durante todo el año debido a su valor nutrimental y preferencia de consumo fresco (Sonnewald & Uwe, 2014), además de considerarse como un cultivo cosmopolita debido a que su demanda engloba a más de 100 países productores alrededor del mundo (CONABIO, 2010). Su distribución nativa proviene del continente americano y la mejor producción del tubérculo se origina en temperaturas promedio de 18° a 20°C, aunque esta planta posee una gran capacidad de adaptación en las condiciones de cultivo. Sin embargo la mayoría de los países desarrollados poseen una producción promedio baja que va desde escasas 5 a 25 toneladas, esto debido a la falta de semillas de buena calidad y de cultivos mejorados e incluso el uso inferior de fertilizantes de irrigación, problemas de plagas y enfermedades (FAO, 2008).

1.1. Características y cultivo de papa

La papa pertenece a la familia de las Solanáceas, es una dicotiledónea herbácea de tallo leñoso, con flores bisexuales y raíces fibrosas (Rodríguez-Pérez, 2010). Presentan hojas compuestas por un número impar de folíolos, es decir hojas imparipinnadas. El fruto es una baya redondeada de color verde que se torna amarillenta después de su maduración. Una de las características principales de la planta es que cuenta con tallos subterráneos a partir de los cuales se generan los tubérculos, los cuales tienen como función principal el almacenamiento de nutrientes (SAGARPA, 2010).

Su producción es principalmente en zonas de clima templado con temperaturas medias entre los 13 y 18°C, aunque la especie es tolerante hacia climas un poco más cálidos; la altitud en la que se desarrolla va desde los 1300 a 3300 msnm y dependiendo de la variedad que se cultiva esta podrá adaptarse a mayor o menor altitud. Crece mejor en suelos de textura arenosa con buen drenaje al agua que permita el crecimiento y expansión de las raíces y posteriores tubérculos, los suelos deben ser abundantes en materia orgánica con un pH que oscile entre los 5.0 y 7.0 siendo la profundidad del suelo mayor a los 30 cm. (CONABIO, 2011)

1.2 Formación del tubérculo

La formación de los tubérculos es regulada por una interacción entre señales endógenas y medioambientales coordinadas de forma transcripcional y por cambios metabólicos en la planta (Kloosterman *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2010). Dentro de las condiciones medioambientales que influyen en el cultivo de papa, se sabe que una alta irradiancia y noches más largas promueven un efecto positivo sobre la inducción de la tuberización; es decir periodos cortos de iluminación en combinación con elevada cantidad de luz durante el día resultan en una mayor asimilación de CO₂ por unidad de biomasa seca foliar, esto a su vez provoca una mayor acumulación de almidón foliar durante el día y una tasa alta del transporte de fotosintatos de las hojas al resto de la planta; por lo que la exposición a fotoperiodos cortos en *S. tuberosum* inducen la formación de tuberculos (Jackson, 1999).

Estos procesos son controlados por fitohormonas, principalmente giberelinas, auxinas, estrigolactonas y citocininas. (Carrera *et al.*, 2000; Kloosterman *et al.*, 2007). Este proceso se encuentra marcado por el engrosamiento de la médula y el córtex de tallos subterráneos, generados por la expansión y división celular, además de la deposición masiva de C y N asimilados, tales como las proteínas de almacenamiento y el almidón (Sonnewald, 2014; Coleman 1987; Sonnewald 2001; Börnke *et al.*, 2007).

La brotación del tubérculo se origina por brotes subterráneos llamados estolones. Este proceso requiere del cese gradual de crecimiento en la parte aérea y un cambio en la división celular de la parte basal en la planta (Xu *et al.*, 1998), lo cual deriva en la expansión y división celular, convirtiendo al tubérculo en una gran estructura de almacenamiento (Visser *et al.*, 1994; Appeldoorn *et al.*, 1999). Dicho fenómeno se ve favorecido por fotoperiodos cortos y noches más largas, pero elevadas temperaturas nocturnas y altas concentraciones de nitrógeno inhiben este proceso (Jackson 1999; Abelenda *et al.*, 2011).

Al finalizar la tuberización la actividad meristemática en el ápice del estolón y nodos cesa completamente y el tubérculo entra en un periodo de dormancia (Xu *et al.*, 1998; Claassens y Vreugdenhil, 2000). Donde se presenta una ausencia del crecimiento de alguna estructura en la planta, además de que la planta desarrolla una capacidad para sobrevivir en periodos y condiciones medioambientales desfavorables.

La brotación del tubérculo requiere entonces de la disponibilidad de sacarosa, en ausencia de esta la brotación no sucede por lo que es probable que además de servir como nutriente funcione como una molécula señal además de que durante la brotación del tubérculo resulta importante mantener una constante degradación de almidón, por lo que el brote inicial no requiere una gran movilización de la reserva de almidón pero se requiere de una buena capacidad en la síntesis de sacarosa lo que involucra una rápida conversión de hexosas en sacarosa que debe ser transportada para el crecimiento de los brotes cumpliendo con la demanda de energía (Viola *et al.*, 2007).

1.3 Citocininas

Como se mencionó con anterioridad las citocininas resultan imprescindibles en el proceso de inducción de formación del tubérculo en la papa. La aparición de zeatina en *S. tuberosum* se encuentra estrechamente relacionada con el comienzo de la formación del tubérculo y ésta no se expresa hasta el momento de tuberización (Suttle, 2001; Ortiz y Flórez, 2008).

Las citocininas están relacionadas con diversos procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, además de encontrarse relacionadas con la acción de varios genes. Son derivados de la base adenina que poseen en posición N6 sustituciones que les confieren su efecto hormonal. Se pueden distinguir dos tipos de citocininas: las naturales generadas por las plantas, sintetizadas a partir de 5'-Adenosín monofosfato (5'-AMP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP) por la ruta del ácido mevalónico, y las artificiales (Jordán y Casaretto, 2006).

Dentro de sus funciones moleculares se encuentran promover la división celular estimulando principalmente la fase G1 del ciclo celular y en conjugación con auxinas promueven un nuevo ciclo celular (Smith y Atkins 2002), de igual forma provocan la iniciación de brotes (Howell *et al.*, 2003), organogénesis y androgénesis (Coenen y Lomax 1997), además de demorar o retrasar la senescencia.

Las citocininas pueden existir como hormonas activas de la base adenina libre o como formas conjugadas con azúcares como lo es la ribosa y ribosa 5-fosfato enlazadas al N9 de la adenina. Las primeras pueden ser degradadas por la acción de citocinin-oxidasas que reconvierten a varias en su base adenina o sus derivados, también en otro aspecto son degradadas o inactivadas por O-glicosilación en el grupo hidroxilo terminal en citocininas tipo zeantina o por N-glicosidación en el N3 o N7 de la adenina, el primero de estos es reversible considerándose como una forma de reserva o almacenamiento (Mok y Mok, 2001).

En papa se ha promovido la formación de tubérculos *in vitro* en presencia de 6-benzylaminopurina con un requerimiento de sacarosa en el medio, Akbar *et al.*, (2010) concluyen que la sacarosa y el (BAP) son poderosos materiales de inducción de microtubérculos de papa mediante reproducción *in vitro*, al realizar pruebas con tres distintas concentraciones de sacarosa (0, 60 y 80 g/L) y distintos niveles de BAP (0, 12, 15 y 18 mg/L), obteniendo un mayor número de microtubérculos en combinación de 60 g/l de sacarosa y 15 mg/L de BAP

1.4 Cinetina (6-furfurilamino purina).

Dentro del grupo de las citocininas se encuentra la cinetina, una hormona sintetizada de forma artificial, posee una conformación relativamente sencilla (Fig. 1), como todas las citocininas es derivada de la base adenina siendo esta hormona la que mayor parecido guarda con esta base (Raven, 1992).

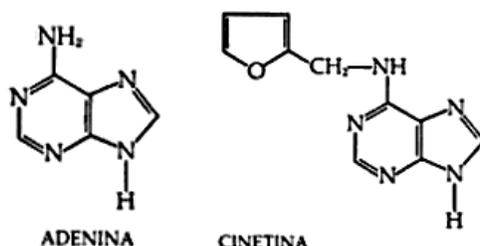


Figura 1. Conformación estructural y similitudes entre adenina y cinetina.

Con respecto a su funcionamiento se ha observado que promueve el alargamiento de los tejidos laminares y una menor elongación de las nervaduras en hojas de plantas adultas; mientras que en plántulas recién germinadas promueve la expansión de hojas y alargamiento de tallos de los epicotilos además de la elongación de peciolo fenómeno similar al causado por la luz roja (Miller, 1956). Los procesos donde se encuentra implicada la cinetina principalmente son: el retraso de la senescencia, la acumulación de metabolitos en la hoja, la síntesis en hoja de proteínas y ácido ribonucleico (ARN principalmente y en menor medida ADN); a grandes rasgos la actividad proteica resulta mayor en presencia de la hormona cinetina (Osborne, 1962). Además de ayudar en la generación de brotes y embriones somáticos de en algunas especies vegetales en condiciones *in vitro* como en *Ficus carica*, *Heliconia rostrata* y *Coffea arabica* L. (Fráguas, 2004; Torres 2005; Pereira, 2007).

Para el cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. Hoque (2010) observó la tuberización de explantes a dos diferentes concentraciones de sacarosa (3% y 6%) y diversos tratamientos de cinetina (1, 2, 3 y 4 mg/L), obteniendo que existe formación de tubérculos con la presencia de la hormona y sin la presencia de la

ésta y a concentraciones de sacarosa al 3% no existe un efecto en la formación de microtubérculos, pero si existe tuberización a concentraciones de sacarosa al 6%; por lo que reporta que esta última es un importante factor para la tuberización.

1.5 Fotosíntesis y Fotosistema II.

La luz utilizada en la fotosíntesis es captada por pigmentos dentro de los cloroplastos, en plantas los pigmentos más abundantes son la clorofila *a* y *b*, todas las clorofilas forman parte de un complejo estructural antena, el cual es el encargado de la captación de electrones que serán utilizados en los fotosistemas. Estos complejos antena transfieren la energía a los centros de reacción fotoquímicos, dicha energía química es almacenada a través de la formación de enlaces químicos, este proceso depende entonces de varios pigmentos y proteínas de transferencia de electrones. Estas reacciones iniciales de la captación de energía de la fotosíntesis se llevan a cabo en dos complejos fotoquímicos, conocidos como Fotosistemas I y II (PSI y PSII), los cuales actúan en serie para llevar a cabo este proceso. El fotosistema I absorbe preferentemente luz del rojo lejano de longitudes de onda mayores de 680 nm, mientras que el fotosistema II absorbe preferentemente luz del rojo de 680 nm y funciona deficientemente a longitudes de onda del rojo lejano. De igual forma el fotosistema I produce un reductor fuerte, capaz de reducir el NADP^+ (Fig. 2), y un oxidante débil; mientras que el fotosistema II produce un oxidante muy fuerte capaz de oxidar el agua, y como un reductor más débil que el producido por el fotosistema I, esto sucede en el lumen del tilacoides donde libera protones, siguiendo esta reacción: $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

La membrana de los tilacoides se encuentra embebida de proteínas esenciales para la fotosíntesis, como los complejos antena, centros de reacción, complejos proteína pigmento de las antenas además de la mayoría de las enzimas de transporte electrónico. El fotosistema II se encuentra ubicado principalmente en la grana junto con sus clorofilas del complejo antena y proteínas asociadas de transporte electrónico, mientras que el centro de reacción del fotosistema I, sus

pigmentos asociados y las proteínas de transferencia de electrones, así como la enzima que cataliza la formación de ATP, están casi exclusivamente en las lamelas del estroma y en los extremos de los grana. El citocromo b_6f de la cadena de transporte electrónico está distribuido en las membranas tilacoidales que se sitúan entre el estroma y el grana pues conecta a ambos fotosistemas (Taiz y Zeiger, 2006).

1.6 Cadena de transporte electrónico.

El proceso de fotosíntesis está acompañado por un flujo de electrones cedidos por la clorofila especializada de los centros de reacción (P680 en el PSII) al ser excitada por los fotones, el electrón cedido se mueve a través de una serie de transportadores electrónicos que finalmente reducen al P700 en el PSI (Fig. 2).

Los procesos químicos que producen las reacciones luminosas de la fotosíntesis son llevados a cabo principalmente por cuatro complejos proteicos, el PSII, el complejo citocromo b_6f , PSI y la ATP sintasa, los cuales están orientados de forma vectorial en la membrana de tilacoides.

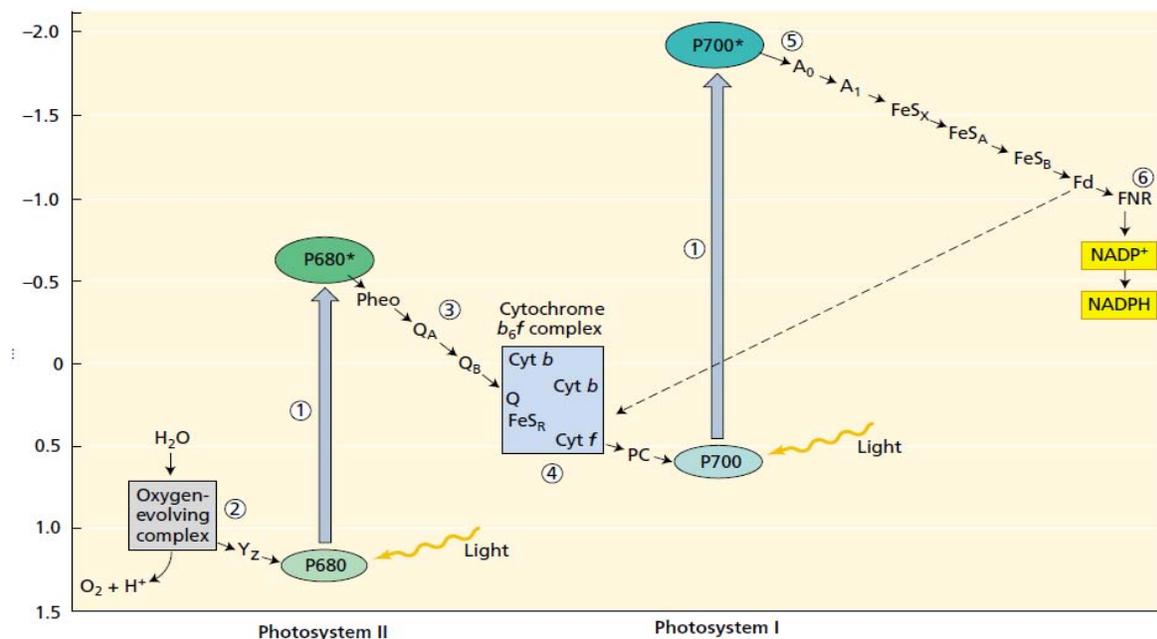


Figura 2. Esquema en z de la fotosíntesis muestra el transporte electrónico entre el PSII y PSI (Imagen tomada de: Taiz y Zeiger, 2006).

El citocromo b_6f recibe estos electrones del PSII cediéndolos al PSI, además de transportar protones al lumen desde el estroma. El PSI reduce NADP^+ A NADPH en el estroma mediante la ferredoxina (Fd) y una flavoproteína ferredoxina-NADP reductasa (FNR). Y mediante la ATP sintasa se produce ATP a medida que los protones difunden, desde el lumen de vuelta al estroma. (Fig. 3).

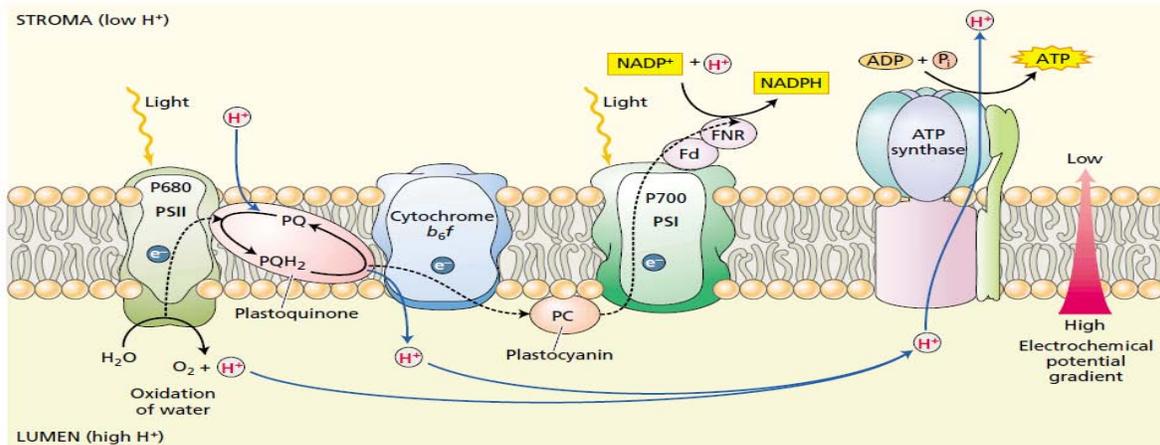


Figura 3. Transferencia de protones y electrones en la membrana de tilacoides mediante los cuatro complejos de proteínas (Imagen tomada de: Taiz y Zeiger, 2006).

1.7 Fluorescencia.

En los complejos antena la energía de un fotón absorbido se suma a la de la molécula pigmento que la absorbe, quedando ésta en un estado excitado inestable, con la posibilidad de ceder este exceso de energía o excitón y volver a su estado fundamental de energía mínima, este proceso de desexcitación sucede mediante la pérdida de energía en forma de calor mediante la transferencia de esta energía a otras moléculas cercanas o como la liberación de energía radiante como fotón visible de menor energía que el causante de la excitación, este último fenómeno es conocido como fluorescencia (Berg *et al.*, 2008).

Durante el evento fotoquímico primario la clorofila excitada pierde un electrón existiendo la separación de una carga eléctrica en el centro de reacción, quedando la clorofila a oxidada ($\text{Chl } a^+$) y una molécula de feofitina aceptora del

electrón reducida (Pheo⁻), en este proceso se utilizan alrededor del 97% de los fotones absorbidos el 2.5% se transforman en calor y el 0.5% se re-emiten como luz fluorescente roja. En las plantas la clorofila *a* de los fotosistemas I y II son las encargadas de la emisión de la fluorescencia, sin embargo a temperatura ambiente (25°C) la contribución del PSI a la emisión total es mínima en comparación con el PSII. Entonces la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila *a* en las hojas de una planta resulta imprescindible para brindar información sobre la eficiencia fotoquímica en el fotosistema II y la disipación térmica de la energía absorbida por los complejos antena (Maxwell & Johnson 2000). Dichos cambios son observables mediante una Curva de inducción de fluorescencia de clorofila *a* o curva OJIP. Esta emisión de fluorescencia es directamente con la cadena de transporte electrónico del PSII (González *et al.*, 2008). De esta forma la curva OJIP refleja si la planta se comporta de forma distinta con respecto a los factores de su entorno los cuales influyen directamente en la emisión de la fluorescencia.

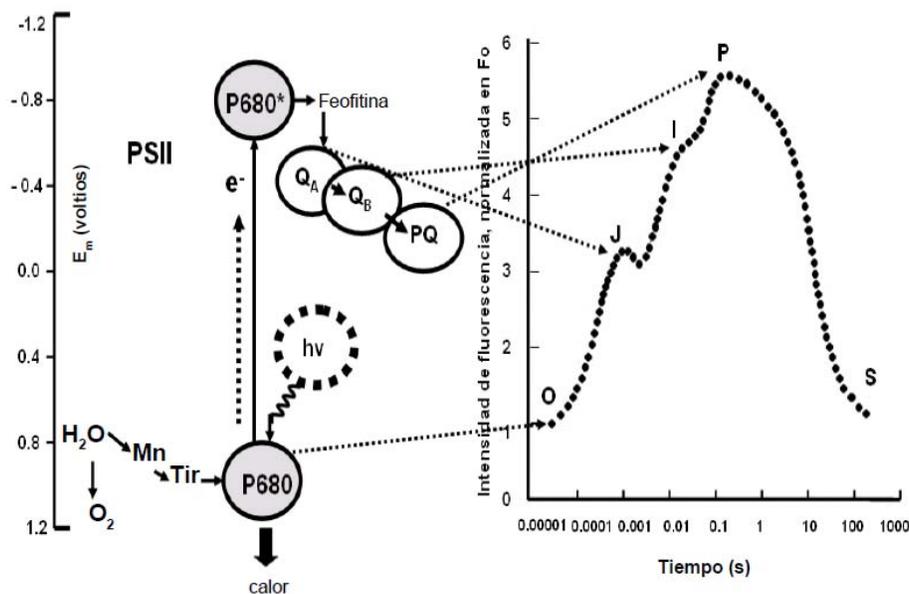


Figura 4. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II en la fase rápida y su relación con las reacciones de la cadena transportadora de electrones (Imagen tomada de: González *et al.*, 2008).

La curva OJIP (Fig. 4) está relacionada con los eventos primarios del PSII, asignándole a cada uno de ellos una de las letras contenidas en el nombre de dicha curva. De esta forma “O” corresponde al valor mínimo de la fluorescencia (F_0), el cual aparece alrededor de los 50 μ s después de ser excitada la clorofila con luz, en ese momento todos los centros de reacción están oxidados. J se desarrolla a los 2 ms y se encuentra relacionado con la reducción parcial de Q_A y Q_B . I se origina a los 20 ms momento relacionado con la reducción parcial de Q_A y Q_B . P es el valor máximo de la fluorescencia (F_m) y se alcanza alrededor de 1s en este momento todos los centros de reacción se encuentran reducidos “cerrados”. De la misma forma el flujo de energía puede ser entendido por diversos parámetros obtenidos mediante fluorescencia, estos son: El flujo absorbido o flujo de fotones absorbido por pigmentos antena abreviado como ABS; El flujo atrapado o flujo de energía transferida al centro de reacción que será convertida en energía redox reduciendo Q_A a Q_A^- (TR); El flujo de transporte electrónico que surge al oxidarse Q_A^- lo que inicia el transporte de electrones que conduce a la fijación de CO_2 (ET) y el flujo de disipación de energía (DI)(Brack y Frank, 1998; González *et al.*, 2008).

Con los anteriores parámetros es posible calcular la eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria ϕ_{PO} ; la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón más allá de Q_A^- en la cadena transportadora de electrones Ψ_O ; la probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones ϕ_{EO} ; y el producto cuántico máximo de disminución de excitación fotoquímica ϕ_{DO} . El producto cuántico de la fotoquímica primaria ϕ_{PO} es denominado también como la fase luminosa, debido a que su valor puede ser modificado por la intensidad lumínica. Por otro lado, la eficiencia con la que un excitón atrapado mueve un electrón después de Q_A^- en la cadena de transportadora de electrones (Ψ_O), es denominada fase térmica, ya que ésta no es modificada por la intensidad lumínica pero si por la temperatura, lo cual resulta de gran interés para el análisis de diferentes condiciones de estrés a las cuales es expuesta un organismo (Maxwell & Johnson 2000; González *et al.*, 2008; Brestic y Zivcak, 2012).

Con respecto a los trabajos realizados para la evaluación del PSII mediante fluorescencia, en plantas de *Solanum tuberosum* L., se ha señalado que al ser suministradas con la hormona cinetina se provoca una disminución del flujo de electrones antes de J en la curva OJIP (Paz, 2014).

1.8 Cultivo *in vitro* y medios de cultivo.

El cultivo de tejidos vegetales mediante técnica *in vitro* resulta de gran importancia en la actualidad, debido al rápido desarrollo de organismos en espacios reducidos, bajo condiciones asépticas y controladas que permiten la propagación clonal y conservación de germoplasma de diversas especies (Rivera-Domínguez, 2006). Sin embargo desde mediados del siglo pasado el medio de cultivo más utilizado ha sido el Murashige y Skoog (1962) y para el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) se han utilizado diversas variantes del mismo pues este ofrece buenos resultados en su propagación y tuberización, este último proceso favorecido por la presencia de sacarosa y cinetina en el medio (Hoque, 2010).

Sin embargo el medio MS resulta complejo en su elaboración, además de que se ha observado que el cultivo *in vitro* de *S. tuberosum* en medio MS sólido la planta no es capaz de desarrollar hojas de un tamaño adecuado que permitan conocer más sobre su estado y evaluar distintas variables, pues las plantas crecidas bajo condiciones *in vitro* se encuentran influenciadas bajo el ambiente físico, químico y gaseoso del recipiente que las contienen desarrollándose así un estado de crecimiento parcialmente heterótrofo (Cañal, *et al.* 2001), por lo que se torna importante el desarrollo y conocimiento de medios de cultivo alternos que simplifiquen la tarea y brinden las características adecuadas para el crecimiento de la planta.

Una forma de cultivo *in vitro* que ha proporcionado ventajas en el crecimiento de los organismos es el medio líquido, el cual sin la presencia de un gelificante facilita el intercambio de gases y la absorción de nutrientes por el tejido, manifestando un crecimiento en menor tiempo, pues se evita que los nutrientes formen parte de la matriz del gel dificultando su difusión (Albany, *et al.* 2015), además de proveer

condiciones de cultivo más uniformes a las plantas, resultan sencillos en la renovación del medio, la esterilización es posible por medio de microfiltración y permiten mayor aireación de las raíces a los cultivos (Etienne y Berthouly, 2002).

El empleo de medios líquidos en sistemas de inmersión para el cultivo de diversas variedades de papa, han demostrado una gran eficiencia en la producción de microtubérculos, en comparación con la utilización de medios semisólidos, obteniendo un promedio de 3 tubérculos por nodo con un peso alrededor de los 0.5 g (Akita y Takayama, 1994; Etienne *et al.*, 1999). Es por ello que se prevé la posibilidad de utilizar un medio de cultivo hidropónico en una técnica *in vitro* que confiera al cultivo una eficiencia similar con respecto al medio MS. Para ello una de las soluciones nutritivas más ampliamente utilizadas en hidroponía es la propuesta por Hoagland debido a su facilidad de preparación con respecto a otras soluciones nutritivas y que no se ve estrictamente ligada a una técnica específica, además de contener las características ideales para el crecimiento de diversas hortalizas (Hoagland & Arnon, 1950).

2. Hipótesis.

Existe una diferencia en la fotoquímica primaria del fotosistema II al comienzo de la tuberización de *Solanum tuberosum* L. var. alpha por efecto de la presencia de cinetina, sacarosa y acumulación de almidones en planta favorecida por la utilización de distintos fotoperiodos y la utilización de dos medios de cultivo líquido.

3. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Evaluar la influencia de cinetina mediante fluorescencia de clorofila *a* sobre la fotoquímica primaria y tuberización de *Solanum tuberosum* L. var. Alpha en dos medios de cultivo *in vitro* tomando en cuenta una acumulación de almidón en la planta por efecto del fotoperiodo.

3.2 Objetivos particulares

Medir la acumulación de almidón en plantas de *Solanum tuberosum* L. var. alpha al reducir su exposición de horas/luz y aumentar el flujo fotónico

Comparar la fotoquímica primaria del fotosistema II para *Solanum tuberosum* L. var. Alpha mediante fluorescencia y cuantificación de clorofila en presencia o ausencia de cinetina.

Obtener una formación adecuada de hojas en *S. tuberosum* L. var. alpha para la medición de fluorescencia mediante la utilización de dos medios de cultivo *in vitro* líquidos.

Comparar desarrollo de *S. tuberosum* L. var. alpha al utilizar solución nutritiva Hoagland y medio MS en técnica *in vitro* mediante el análisis de la fotoquímica primaria del fotosistema II y peso fresco en la planta.

Evaluar la importancia de la sacarosa para el proceso de inducción y formación del tubérculo en *S. tuberosum* L. var alpha y comparar sus efectos mediante fluorescencia de la clorofila *a*.

4. Material y Método.

4.1 Material vegetal

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se utilizaron plantas de *Solanum tuberosum* L. var. alpha en cultivo *in vitro* obtenidas del Programa Nacional de Papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) en Metepec, Estado de México. Se propagaron usando explantes de tallo con dos nudos, en tubos de ensayo (15 x 2.5 cm.) con medio semisólido de Murashige y Skoog (1962), adicionado con 3% de sacarosa, 0.4 mg/L tiamina, 60 mg/L de inositol y 8 g/L de agar. Creciendo bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz, con luz artificial fluorescente y temperaturas de 22 a 26°C, hasta obtener plántulas suficientes para iniciar los tratamientos.

4.2 Aclimatación.

Se seleccionaron 480 plántulas de *S. tuberosum*, cada una con 3 cm de altura aproximadamente y raíz desarrollada, se cultivaron en tubos de ensayo estériles que contenían medio líquido de Murashige y Skoog (1962) (**MS**) con los macronutrientes y micronutrientes descritos en la técnica, ajustando el pH en 5.7 y sin adición de agar, sacarosa, ni reguladores de crecimiento. La solución se esterilizó bajo campana de flujo laminar con un filtro Ultra Cruz™ Syringe Filter de 0.45 µm de poro evitando así su precipitación y colocando 5 ml por cada tubo.

Se crecieron las plantas por 5 días bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, con luz fluorescente de una intensidad lumínica de 300 µmol m⁻²s⁻¹ y temperaturas entre los 22 a 26 °C.

4.3 Acumulación de almidón.

Transcurrido el tiempo de aclimatación se crearon dos grupos, cada uno con 240 plantas, a uno de ellos se le redujo el fotoperiodo a 8 h/luz-16 h/oscuridad como inductor de la síntesis de almidón (Jackson, 1999), mientras que el grupo restante se mantuvo en el fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, ambos grupos

permanecieron en esta condición por 5 días, después de este periodo se determinó la concentración de almidón entre ambos grupos (mediante la técnica descrita por Bougoulaw *et al.* (1994), una vez que se corroboraron diferencias en la acumulación de almidón en hoja entre los dos fotoperiodos se procedió a aplicar los tratamientos.

4.4 Aplicación de tratamientos.

Cada grupo con diferente fotoperiodo (8h/Luz y 16h/Luz), se dividió en 6 formando conjuntos de 40 plantas cada uno, entre los cuales se aplicaron los siguientes medios de cultivo:

Medio **MS** sin reguladores de crecimiento ni sacarosa (**MS**) (Control negativo de tuberización); 2) Medio **MS** adicionado con cinetina 3 mg/L y 3% de sacarosa (**MS+C+S**) (Control positivo de la tuberización); 3) Medio **MS** adicionado con 3 mg/L de cinetina (**MS+C**); 4) Medio **Hoagland** sin reguladores de crecimiento (**HG**) tal como se describe por Hoagland y Arnon (1950) (Control negativo de tuberización); 5) Medio **Hoagland** adicionado con 3 mg/L de cinetina y 3% de sacarosa (**HG+C+S**) (Control positivo de tuberización); 6) Medio **Hoagland** adicionado con 3 mg/L de cinetina (**HG+C**).

Para cada medio utilizado se ajustó el pH a 5.7 y se esterilizó mediante la misma técnica descrita para las plantas en aclimatación y para ambos fotoperiodos la intensidad lumínica fue de $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con temperaturas entre los 22 a 26 °C. En estas condiciones las plantas permanecieron por 20 días, en los cuales al inicio (día 0) y término (día 20) se les cuantificó la cantidad de almidón y clorofila en hoja; por otro lado cada tercer día se extrajeron del cultivo *in vitro* tres plantas al azar en las cuales se procedió a medir fluorescencia, y peso fresco, todo esto se realizó entre las 10-12 am.

4.5 Medición y Manejo de resultados.

4.5.1 Fluorescencia y peso fresco.

Cada tres días partiendo del día 0 se realizaron mediciones de peso fresco de la planta y fluorescencia en hoja, este último posterior a un pre-acondicionamiento de

las plantas a oscuridad durante 15 min y con la utilización de un fluorómetro FluorPen FP100. Los resultados de la fluorescencia fueron graficados mediante curvas de Inducción de fluorescencia de la clorofila *a* (fase rápida OJIP). Mientras que los valores de Flujos específicos por centro de reacción, eficiencias cuánticas obtenidos mediante el mismo aparato y peso fresco se analizaron mediante un análisis de varianza de dos factores y en aquellos casos en los que existieron diferencias significativas se procedió a la realización de la prueba de Tukey $\alpha=0.05$, se presentan únicamente los valores de los días más significativos para la presente investigación.

4.5.2 Almidón en hoja.

Al comienzo y término del experimento se cuantificó la cantidad de almidón en hoja por la técnica modificada de Boguslaw *et al.* (1994).

Tabla 1. Determinación de almidón en hoja. Cantidad en ml de las soluciones utilizadas para la curva patrón

Cantidad de almidón (mg)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18
Solución de almidón (ml).	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Stock I-KI (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O (ml)	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Solución Stock I-KI: 0.2g I +2.0g KI/100ml; Solución Almidón 2mg/100ml.

Donde los volúmenes de solución stock de Yodo-Yoduro potásico fueron modificadas estandarizando a 1ml por cada 10 ml del volumen total, como indicador de la presencia de almidón, además de calentar por 10 minutos las muestras para favorecer la dilución del almidón contenido (Tabla 1), se midió mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 620 nm.

La obtención de la muestra para la cuantificación de almidón se realizó a partir de una hoja de *S. tuberosum* tomada de la parte media de la planta, y la extracción de almidón se realizó mediante a la técnica descrita por Takushi *et al.* (2007), el

resultante se colocó en un tubo de ensayo que contenía 1 ml de solución Stock I-KI y se completó hasta 10 ml totales con agua destilada, la muestra fue medida a una longitud de onda de 620 nm y se expresó el resultado en mg de almidón/g de tejido fresco para su posterior análisis de varianza y prueba de Tukey $\alpha=0.05$.

4.5.3 Clorofila.

La cantidad de clorofila **a**, **b** y la relación de clorofilas **a/b** se realizó de acuerdo a la metodología de Arnon (1949) siguiendo las ecuaciones a continuación descritas:

$$Cl_a = (0.0127)(Abs\ 663) - (0.00269)(Abs\ 645)$$

$$Cl_b = (0.0229)(Abs\ 645) - (0.00468)(Abs\ 663)$$

Para la obtención de la muestra se maceró 1 g de tejido en 5 ml de acetona al 80% dicha muestra se centrifugo a 2700 rpm durante 10 minutos para posteriormente medir el sobrenadante a una longitud de onda de 663 nm y 645 nm y realizar un ANOVA de dos factores con los valores obtenidos. Con los resultados de clorofila **a** y **b** se procedió a revisar y graficar la relación de Clorofila **a/b** para analizar posibles relaciones.

Todos los análisis de varianza y pruebas de Tukey anteriormente descritas se realizaron mediante el Software Sigmaplot V.11.

5. Resultados.

5.1 Crecimiento y Formación de los tubérculos.

La utilización de medio líquido mostró una diferencia en cuanto al desarrollo de hojas en *S. tuberosum* var. alpha las cuales se presentaron de mayor tamaño, con diámetros cercanos a los 5 mm, mientras que las plantas en medio sólido permanecieron con hojas de 2 mm aproximadamente, estas resultaron ideales para realizar de manera correcta las mediciones de fluorescencia esto en comparación con las plantas que se cultivaron inicialmente en medio sólido las cuales no lograron un buen desarrollo de hojas y tallos, tal como se muestra en la figura 5.



Figura 5. Cultivo *in vitro* de *S. tuberosum* var. alpha en medio de cultivo sólido (izquierda) y líquido (derecha).

Con respecto a la formación de tubérculos en *S. tuberosum* L. var. alpha esta se observó en el día 8 para los tratamientos **MS+C** y **HG+C** al igual que en los controles positivos **MS+C+S** y **HG+C+S** que permanecieron en un fotoperiodo corto (8 h/luz); como se esperaba durante los 20 días de mediciones los controles negativos **MS** y **HG** no tuberizaron en ninguno de los dos fotoperiodos utilizados (8 h/luz y 16 h/luz). Para el caso de los tratamientos con un fotoperiodo de 16 h/luz los medios **MS+C**, **MS+C+S**, **HG+C** y **HG+C+S** mostraron crecimiento de tubérculos hasta el día 10.



Figura 6. Microtuberculos de *S. tuberosum* var. alpha crecidos en medio de cultivo MS líquido. De izquierda a derecha: MS+C+S, 8 h/luz; MS+C, 8 h/luz; MS+C+S, 16 h/luz; MS+C, 16 H h/luz. Las imágenes presentadas corresponden al día 18.

Los tubérculos formados con el fotoperiodo corto (8 h/luz) se observaron de mayor tamaño con respecto a los del fotoperiodo largo (16 h/luz) y visualmente existe una diferencia entre los tubérculos formados por el medio MS con respecto al medio HG (Fig. 6 y 7) de igual forma aquellos tubérculos que se desarrollaron bajo un fotoperiodo de 16 h/luz no lograron aumentar más su tamaño.



Figura 7. Microtuberculos de *S. tuberosum* var. alpha crecidos en medio de cultivo HG líquido. De izquierda a derecha: HG+C+S, 8 h/luz; HG+C, 8 h/luz; HG+C+S, 16 h/luz; HG+C, 16 H h/luz. Las imágenes presentadas corresponden al día 18.

La cuantificación del peso fresco de las plantas durante el experimento muestra que las plantas exhiben un aumento de peso fresco posterior al periodo de formación de los tubérculos (día 10) considerando sus valores iniciales y los presentados durante los primeros 6 días del experimento, los cuales se encontraron por debajo de los 0.2 mg exceptuando los grupos de plantas pertenecientes al medio **MS** y **HG** crecidos bajo un fotoperiodo de 16 h/luz 8 h/oscuridad los cuales muestran un peso fresco estadísticamente distinto, siendo este mayor, entre 3 y 4 mg, durante los seis primeros días con respecto a los demás tratamientos (Fig. 8). Comparando la utilización de ambos medios de cultivo se observa que no existen diferencias significativamente notables ($P < 0.05$) para el aumento de peso fresco, en el resto de los tratamientos, hasta antes del día 10 las plantas mostraron un comportamiento similar en el medio Hoagland y MS.

El aumento del peso fresco es aparentemente más pronunciado a partir del día 10 momento en el cual inició el proceso de tuberización en los tratamientos. A diferencia del medio **HG**, el medio **MS** en ambos fotoperiodos muestra valores cercanos entre sí para los días posteriores (Fig. 8-e y g), desapareciendo las diferencias marcadas antes del día 10 ($P < 0.05$). Los medios **MS+C** y **MS+C+S** muestran diferencias significativas entre ellos para el día 12 teniendo un mayor peso fresco los medios que contenían únicamente cinetina, el medio **MS+C** correspondiente al fotoperiodo 8 h/luz presenta plantas con un peso fresco mayor (0.23 mg) que las plantas bajo el fotoperiodo 16 h/luz (0.19 mg) y en comparación con las plantas del medio **MS+C+S**

Al finalizar las mediciones el medio **MS+C+S** de las plantas con un fotoperiodo de 16 h/luz mostró un mayor aumento de peso fresco teniendo en promedio 0.55 mg en comparación con los demás tratamientos del mismo medio que se encuentran por debajo de los 0.46 mg. de peso fresco.

El análisis de varianza ($P < 0.05$) realizado para la comparación entre las variantes del medio Hoaglan y el medio MS no presento diferencias significativas por lo que se infiere que el comportamiento de ambos medios resulta muy similar.

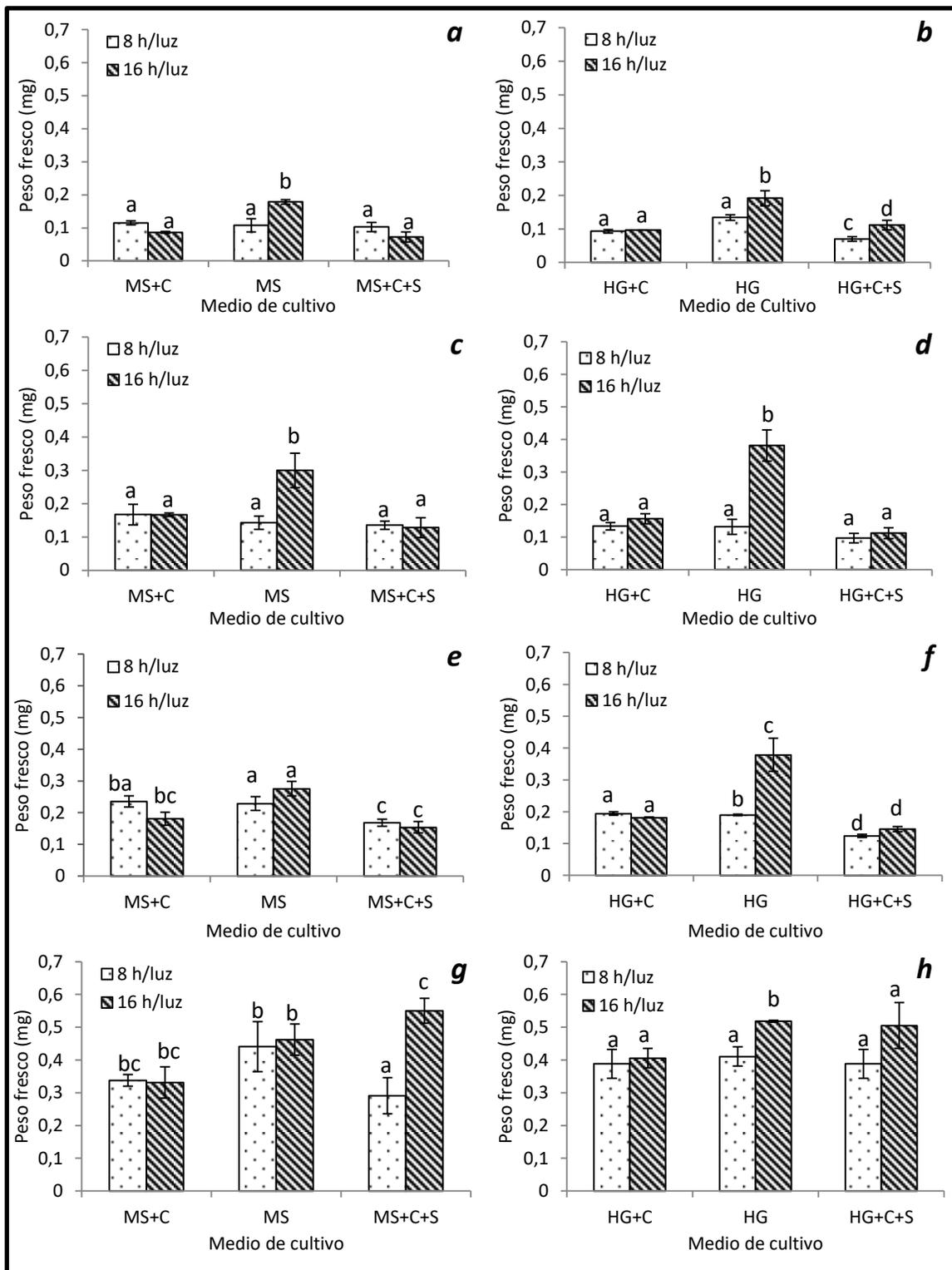


Figura 8. Comparación de peso fresco en plantas de *S. tuberosum* L. var. alpha crecidas en medio líquido MS y Hoagland para ambos fotoperiodos (8 y 16 h/luz). **a y b.** Día 0; **c y d.** Día 6; **e y f.** Día 12; **g y h.** Día 18. Letras Iguales no existe diferencia entre los tratamientos. Promedio \pm S.E. $n=3$.

5.2 Cuantificación de almidón en hoja.

Los valores obtenidos mediante la cuantificación de almidón en hoja muestran que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ambos fotoperiodos utilizados, mostrando una mayor acumulación de almidón (**MS**:0.44 mg/g de t.f.; **MS+C**:0.59 mg/g de t.f.; **MS+C+S**:0.88 mg/g de t.f.; **HG**: 0.52 mg/g de t.f.; **HG+C**: 0.60 mg/g de t.f.; **HG+C+S**: 0.93 mg/g de t.f.) en las plantas en el fotoperiodo de 8 h/luz para el comienzo de las mediciones (día 0), en comparación con los tratamientos que crecieron en un fotoperiodo de 16 h/luz. Dichas diferencias se presentan en todos los medios del día 0 a excepción del medio **HG** el cual a pesar de mostrar un aumento en la cantidad de almidón acumulado no resulta estadísticamente significativo (Fig. 9-b)

Las mediciones realizadas en el día 20, posterior a la tuberización de los diferentes tratamientos muestran una disminución en la presencia de almidón en hoja, dicha disminución solo se muestra para el fotoperiodo corto 8 h/luz y en los medios **MS**, **MS+C**, **HG**, **HG+C+S** y **HG+C** contrario a ello el tratamiento **MS+C+S** y los grupos que permanecieron en un fotoperiodo largo mostraron un incremento en la cantidad de almidón presente en hoja (Fig. 9-c y 9-d).

Las plantas que crecieron en los medios que contenían sacarosa (**MS+C+S**: 0.88 mg/g de t.f. y **HG+C+S**: 0.93 mg/g de t.f.) presentaron los valores más elevados de acumulación de almidón con respecto a los tratamientos que no la contenían, esto para ambos fotoperiodos dichas diferencias son observables en la figura 9-a y b. De igual forma se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la cantidad de almidón cuantificado al comienzo y término de las mediciones observándose una disminución en la presencia de dicho compuesto para los medios **HG**, **MS**, **HG+C**, **MS+C** y **HG+C+S** pertenecientes al fotoperiodo corto, a pesar de ello el comportamiento entre las variantes del medio Hoaglan y MS resulta ser muy similar pues no existen diferencias significativas entre ellos para ambos días a excepción del medio **MS+C+S**, el cual presentó más almidón durante el día 20 del fotoperiodo 8 h/luz en comparación con el medio **HG+C+S** (Fig. 9-e).

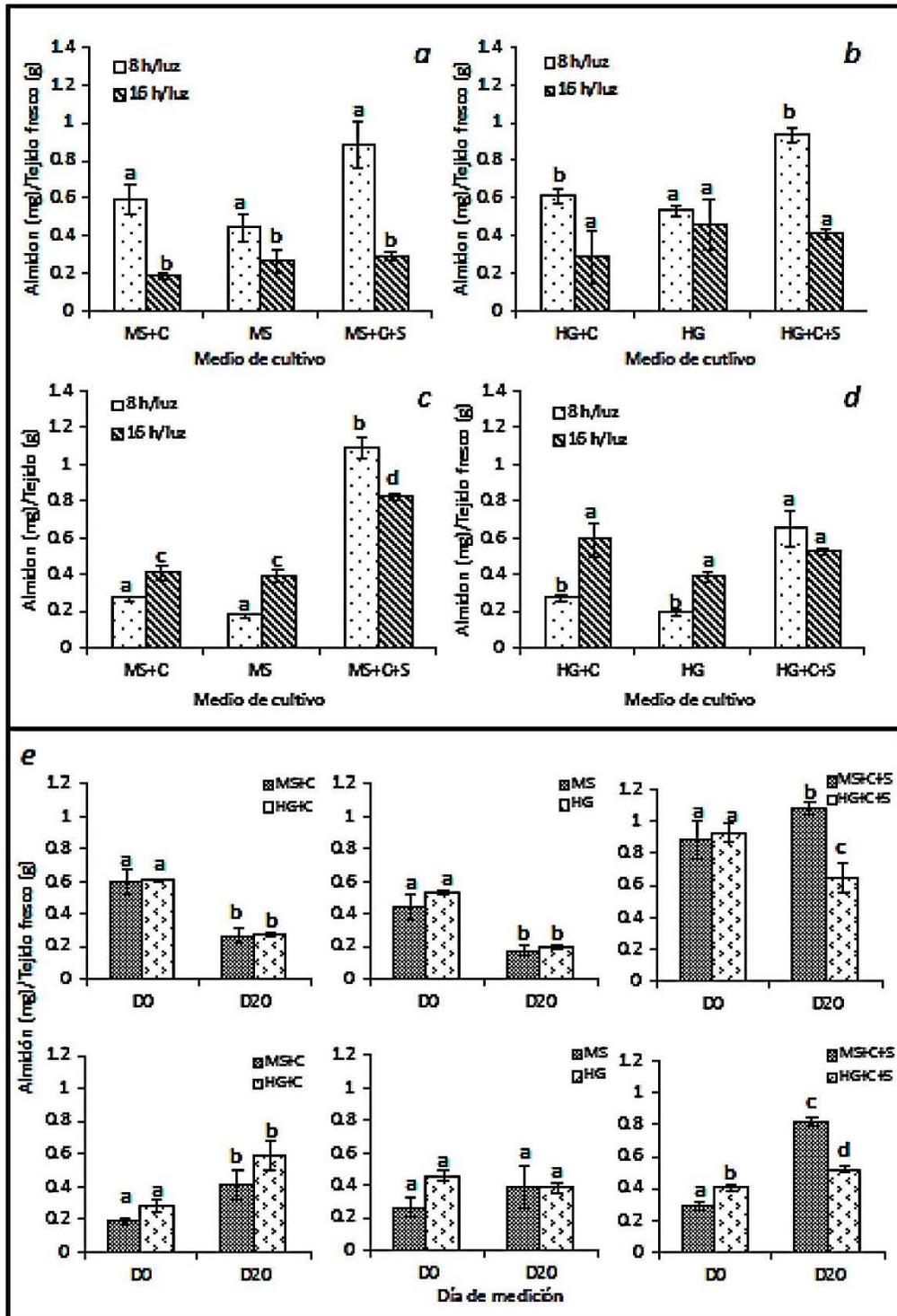


Figura 9. Almidón en hoja en plantas de *S. tuberosum* L. var. alpha. **a y b.** Día 0; **c y d.** Día 20; **e** Medio Hoagland y MS, Arriba fotoperiodo 8 h/luz 16 h/oscuridad; Abajo: fotoperiodo 16 h/luz 8 h/oscuridad. Letras iguales no existe diferencia entre los tratamientos. Promedio \pm S.E. $n=3$.

Con respecto al fotoperiodo de 16 h/luz el medio **MS+C** y **HG+C** se comportan de manera muy similar por día, presentando, en comparación con el fotoperiodo corto, un aumento en la cantidad de almidón presente en hoja para el día 20 con respecto al inicio de las mediciones (Fig. 9-e).

Por el contrario las plantas en medio **MS** y **HG** del fotoperiodo 16 h/luz mantienen valores de almidón similares entre el comienzo (0.26 y 0.45 mg/g de tejido fresco , respectivamente) y término (0.38 y 0.38 mg/g de tejido fresco , respectivamente) del experimento, de igual forma no presentan diferencias estadísticas entre ambos medios como las que se presentan para el fotoperiodo corto (Fig. 9-e). Por último los medios **HG+C+S** y **MS+C+S** presentan diferencias al día 0 de mediciones donde el medio **HG+C+S** resulta en una mayor acumulación de almidón en hoja (0.41 mg/g de tejido fresco), sin embargo al día 20 aunque aún existe acumulación y esta es estadísticamente mayor al comienzo de las mediciones, el medio **MS+C+S** en 16 h/luz resulta acumular una mayor cantidad (0.82 mg/g de tejido fresco) de este carbohidrato para el final de las mediciones en un fotoperiodo de 16 h/luz.

5.3 Cuantificación de clorofila “a” y “b” en hoja

Los valores obtenidos mediante la cuantificación de clorofila *a* en hoja muestran que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$), entre los valores de clorofila encontrados para el día 0 en ambos fotoperiodos utilizados, con excepción del medio **HG+C+S** (Fig. 10-b), el cual muestra una disminución en la cantidad de clorofila para las plantas correspondientes al fotoperiodo 16 h/luz, pasando de 0.15 a 0.09 mg/g de tejido fresco. Para el día 20 se observa una disminución de clorofila *a* en la mayoría de los tratamientos, no obstante los medios **MS+C**, **MS** y **HG+C** (Fig. 10-c, b) no presentaron diferencias significativas entre ambos fotoperiodos utilizados; a diferencia del medio **HG** que aumenta a las 16 h/luz y los medios **MS+C+S** y **HG+C+S** los cuales presentan valores superiores de clorofila *a* en el fotoperiodo 8 h/luz.

La cuantificación de clorofila *a* contenida en hoja en el medio **HG+C** correspondiente al fotoperiodo corto mostró una reducción en la para el último día de mediciones, disminuyendo de 0.14 mg/g de tejido fresco (± 0.03) a 0.07 mg/g de tejido fresco (± 0.02), dicha condición es contraria a la presentada por el mismo medio en el fotoperiodo 16 h/luz, el cual no muestra diferencias significativas en la concentración de dicha clorofila, este medio (**HG+C**) resulto acumular una mayor cantidad de clorofila *a* para el día 0 (0.13 mg/g de tejido fresco) en comparación con el tratamiento **MS+C** que presento mg de almidon/g de tejido fresco 0.09 (Fig. 10-e).

Por otro lado el medio **HG+C+S** en el fotoperiodo 8 h/luz presentó una mayor cantidad de clorofila *a* en el día 0 (0.15 ± 0.01 mg/g de tejido fresco) en comparación con las variantes del medio MS los cuales se encontraron por debajo de los 0.12 mg de clorofila por cada gramo de tejido fresco en la planta, dicho valor se vio disminuido para las mediciones finales de clorofila. (Fig. 10-e).

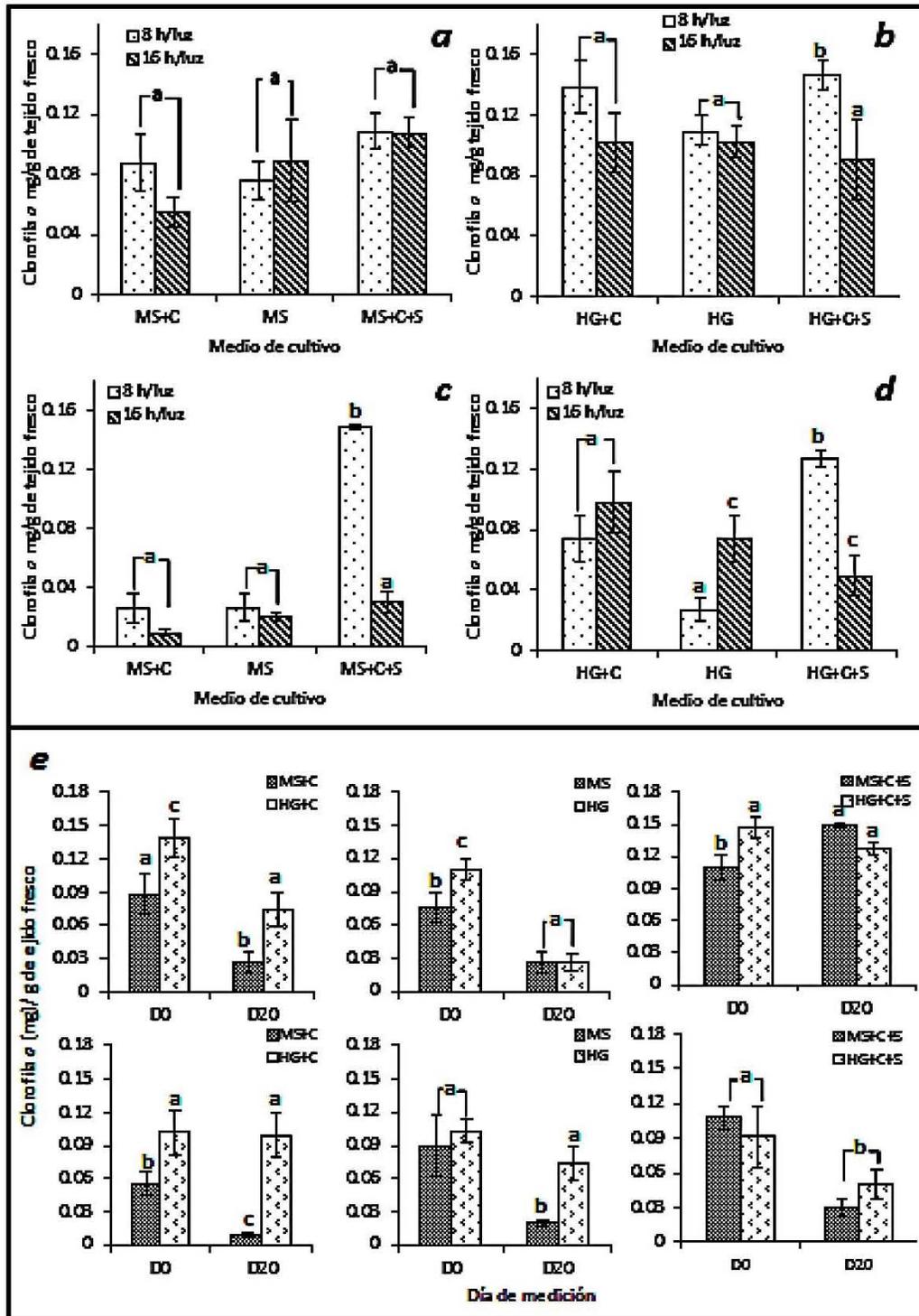


Figura 10. Clorofila a contenida en hoja de *S. tuberosum* L. var. alpha. **a y b.** Día 0; **c y d.** Día 20; **e** Medio Hoagland y MS: Arriba fotoperiodo 8 h/luz 16 h/oscuridad; Abajo: fotoperiodo 16 h/luz 8 h/oscuridad. Letras iguales no existe diferencia entre los tratamientos. Promedio \pm S.E. $n=3$.

Los medios con sacarosa (**MS+C+S**, **HG+C+S**) mostraron una mayor cantidad de clorofila **a** presente en hoja para el día 20 en ambos fotoperiodos, exceptuando el medio **HG+C+S** del día 20 en un fotoperiodo de 16 h/luz, el cual presentó la menor cantidad de clorofila dentro de los tratamientos con medio Hoagland no obstante este valor no es estadísticamente distinto (Fig. 10-e).

En cuanto a la cuantificación de clorofila **b** (Fig. 12) no muestra diferencias significativas ($P < 0.05$), para el día 0 entre ambos fotoperiodos el comportamiento de los medios **MS+C+S**, **HG+C**, **HG** y **HG+C+S** resultan similares entre sí (Fig. 12-a y b) y con cantidades de clorofila en hoja muy semejantes, sin embargo existen diferencias significativas para los dos fotoperiodos utilizados entre los medios **MS+C** y **MS** (Fig. 12-a); el medio Hoagland (**HG+C+S**) con sacarosa presentó la mayor síntesis de clorofila **b** en hoja al comienzo del experimento dicho comportamiento es observable en ambos fotoperiodos correspondiente, sin embargo dicha diferencia no es estadísticamente distinta del medio **MS+C+S**.

Para el caso de estos medio (**MS+C+S** y **HG+C+S**) se presentó una disminución notable en la clorofila **b** para el día 20 en el fotoperiodo largo (16 h/luz) siendo estadísticamente distintos ($P < 0.05$) en comparación con el comienzo de las observaciones, donde el medio **MS+C+S** reduce sus concentraciones de clorofila **b** de 0.04 ± 0.002 mg hasta 0.009 ± 0.003 mg (Fig. 12-e), mientras que el medio **HG+C+S** presenta una disminución de 0.031 ± 0.01 mg. Los medios restantes (**MS**, **MS+C**, **HG** y **HG+C**) mostraron cantidades de clorofila cuantificada similares entre el comienzo y el día 20 del experimento.

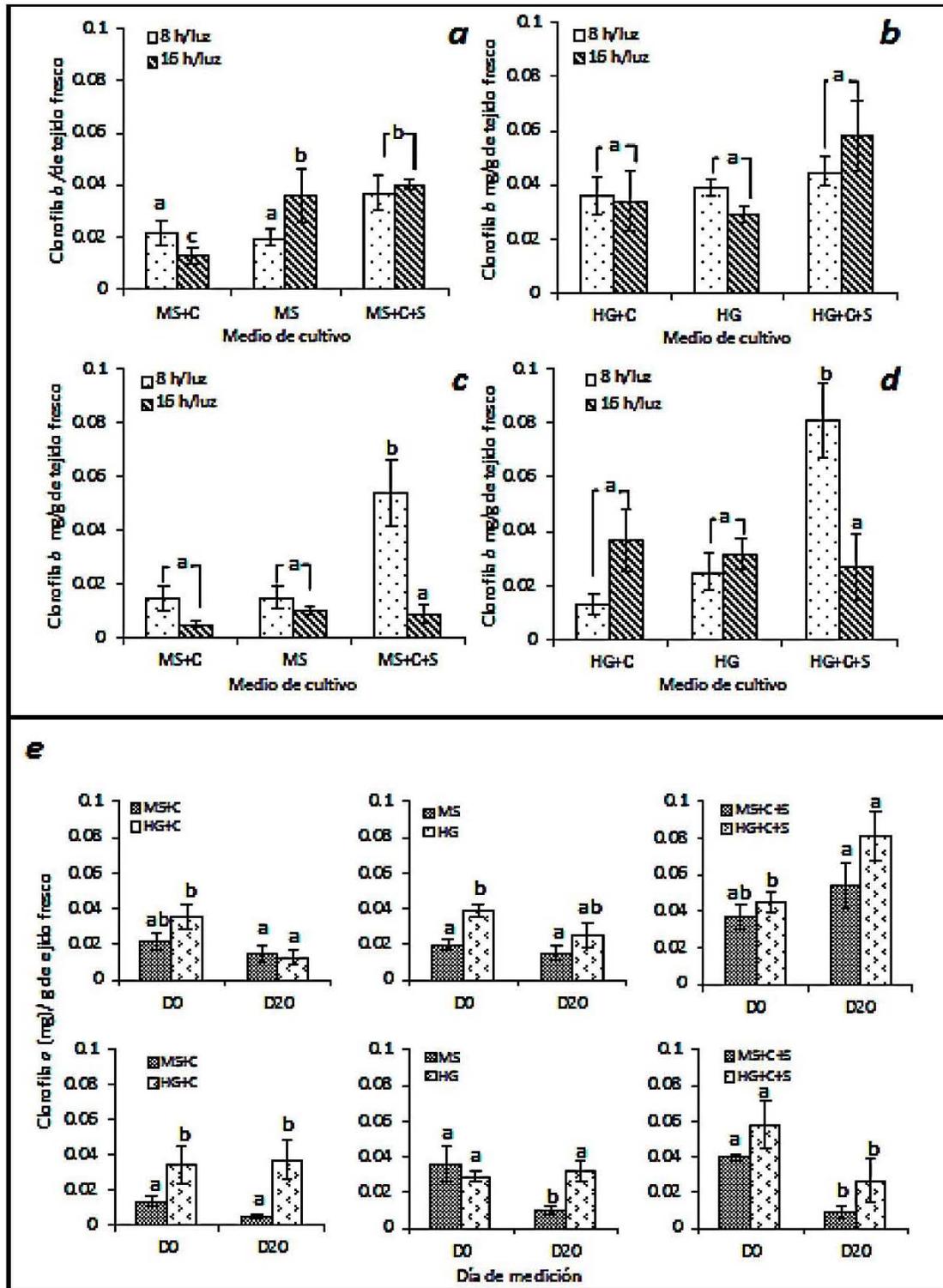


Figura 11. Clorofila *b* contenida en hoja de *S. tuberosum* L. var. alpha. **a** y **b**. Día 0; **c** y **d**. Día 20; **e** Medio Hoagland y MS: Arriba fotoperiodo 8 h/luz 16 h/oscuridad; Abajo: fotoperiodo 16 h/luz 8 h/oscuridad. Letras iguales no existe diferencia entre los tratamientos. Promedio \pm S.E. $n=3$.

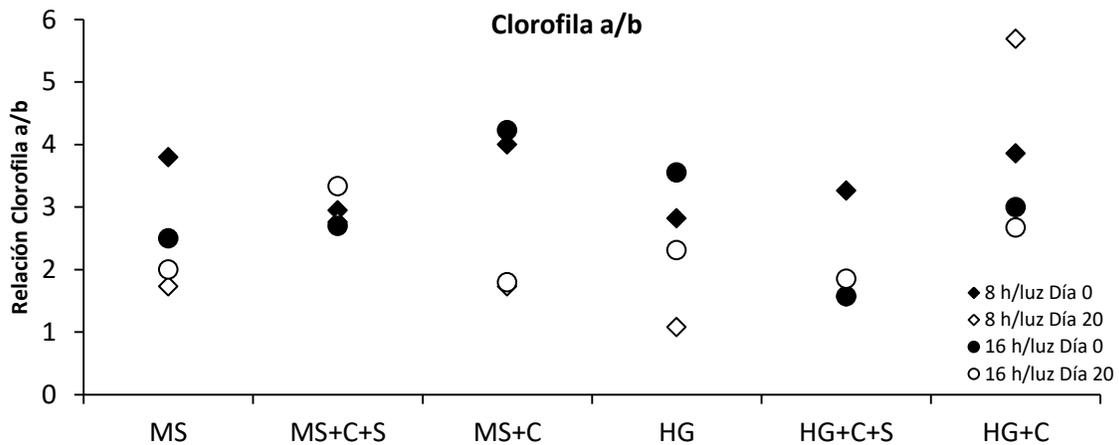


Figura 12. Relación de *Clorofila a/b* en hoja al inicio y término de las mediciones.

Se observó de manera general una disminución en la relación de clorofila *a/b* (Fig. 11), mostrándose aumentos únicamente en los medios que contuvieron sacarosa **HG+C+S** y **MS+C+S** ambos pertenecientes al fotoperiodo 16 h/luz al igual que en el medio **HG+C** correspondiente al fotoperiodo 8 h/luz, en el cual se presentó una relación de 5.7 la mayor de todos los medios analizados.

5.4 Inducción de fluorescencia de clorofila a (fase rápida OJIP)

La obtención de la Curva de inducción de fluorescencia de clorofila **a** muestra una uniformidad en todos los grupos al comienzo de las mediciones. En dichas curvas de inducción se observaron las inflexiones correspondientes a las letras **O**, **J**, **I** y **P** (Fig. 13). El valor de “**O**” que corresponde al valor mínimo de la fluorescencia también conocido como **F_o** se mantienen muy similar para todos los casos a excepción del grupo perteneciente al fotoperiodo 8 h/luz que contenía medio Hoagland en el cual aumenta, pero mantienen la misma cinética que las anteriores curvas. La cinética de todo el gráfico se desarrolla entre los 0.01 ms momento en el cual los centros comienzan a reducirse después de estar oxidados por un pre-acondicionamiento a la obscuridad y hasta los 1000 ms tiempo cercano en el cual las curvas OJIP pertenecientes a *S. tuberosum* alcanzan **F_o** y comienza el decaimiento de la fluorescencia. La letra correspondiente a “**J**” representa la reducción parcial de la quinona “A” (**Q_A**), mientras que “**I**” representa la reducción parcial de **Q_A** a **Q_B**, quedando “**P**” como el valor máximo de la fluorescencia también conocido como **F_m**.

En la figura 14 se muestra la cinética de la fluorescencia en el día 6 previa a la formación del tubérculo observándose para el caso de las variantes del medio MS que en la presencia de cinetina (**MS+C** y **MS+C+S**) existe un aumento de la fluorescencia observable para ambos fotoperiodos (8 h/luz y 16 h/luz), de igual forma se presentó un aumento en la emisión de fluorescencia para el tratamiento **HG+C** en el fotoperiodo 16 h/luz, este aumento en los valores de la curva de inducción de fluorescencia de clorofila **a** se da para la mayoría de los casos a partir del punto **O** con respecto al control para el caso del medio **MS+C+S** del fotoperiodo largo este aumento se da posterior a la fase **J** de la curva, dichos aumentos son causantes de que el valor de la fase **P** en la curva rebase el valor de fluorescencia normalizada de 1 lo cual no sucede para el comienzo de las mediciones al igual que los valores correspondientes a **F_o** se modifican por el mismo efecto (día 0). Las plantas con un fotoperiodo 8 h/luz que contenían cinetina en el medio nutritivo Hoagland (**HG+C**) mostraron valores muy similares al

control negativo (**HG**) no obstante el medio **HG+C+S** mostro una disminución en la fluorescencia emitida, este resultado es contrario a lo observado en las plantas con MS pues como se menciona con anterioridad en **MS+C+S** aumenta la fluorescencia cuantificada. En cuanto a las plantas que permanecieron en un fotoperiodo de 16 h/luz el tratamiento **HG+C** mostro un comportamiento muy similar al tratamiento **MS+C** mostrando una emisión de fluorescencia mayor a la del control negativo (**HG** y **MS** respectivamente).

Con respecto a las mediciones realizadas posterior a los fenómenos de tuberización en *S. tuberosum* var alpha (Fig. 15), para ambos fotoperiodos es posible observar una disminución en la fluorescencia emitida en los grupos **MS+C** y **MS+C+S** con respecto al grupo **MS** esto resulta evidente para ambos fotoperiodos, sin embargo las plantas correspondientes al fotoperiodo 16 h/luz muestran un drástico cambio en cuanto al valor de fluorescencia mínima **F_o** el cual se desplaza hasta un valor normalizado cercano a -1, cuando anteriormente se encontraba cercano al -3. Por otro lado los gráficos correspondientes a las variantes del medio Hoagland muestran una cinética muy similar a la presentada por las del medio MS para el fotoperiodo corto con la excepción de que la emisión de fluorescencia en el medio **HG+C+S** se posiciona como la menor en la curva **OJIP** seguida del medio **HG+C** modificándose desde la fase **O** (Fig. 15).

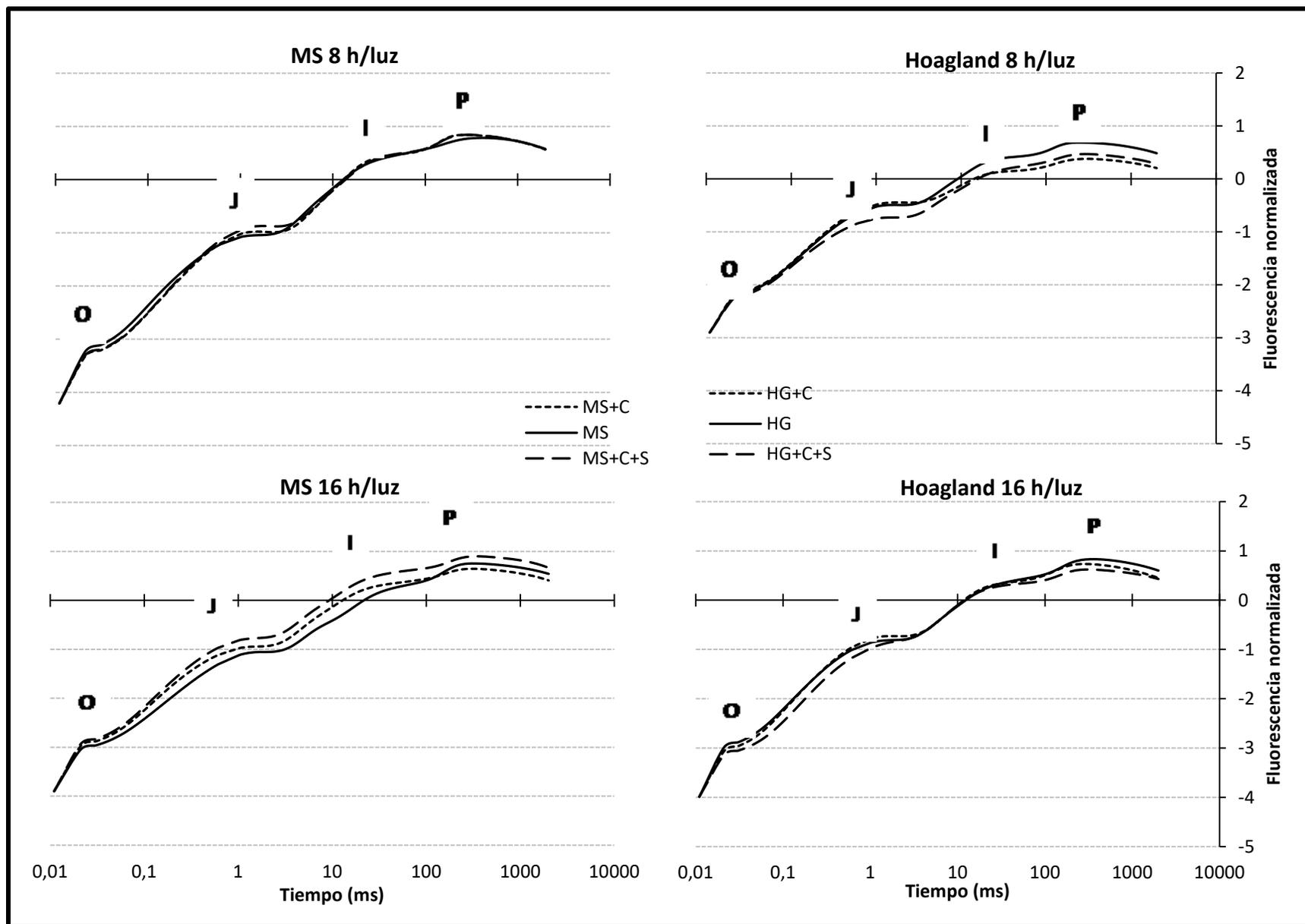


Figura 13. Comportamiento del PSII de *S. tuberosum* L. var alpha en el día 0 mediante curvas de inducción de fluorescencia de clorofila *a* (fase rápida OJIP). **O**: Fluorescencia mínima (F_o). **J**: Reducción parcial de Q_A . **I**: Reducción parcial de Q_B . **P**: Fluorescencia máxima (F_m).

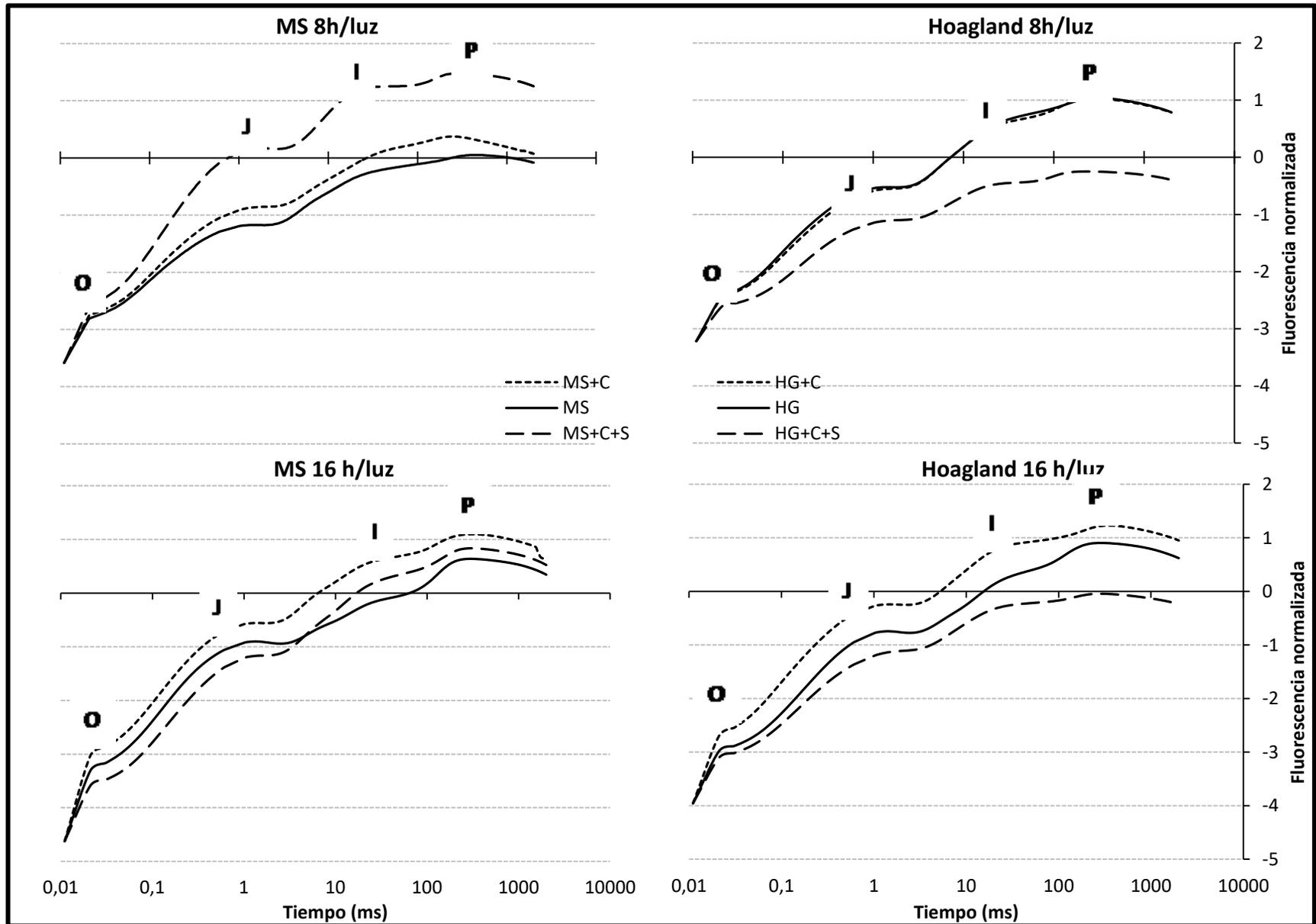


Figura 14. Comportamiento del PSII de *S. tuberosum* L. var alpha en el día 6 mediante curvas de inducción de fluorescencia de clorofila *a* (fase rápida OJIP). **O**: Fluorescencia mínima (F_0). **J**: Reducción parcial de Q_A . **I**: Reducción parcial de Q_B . **P**: Fluorescencia máxima (F_m).

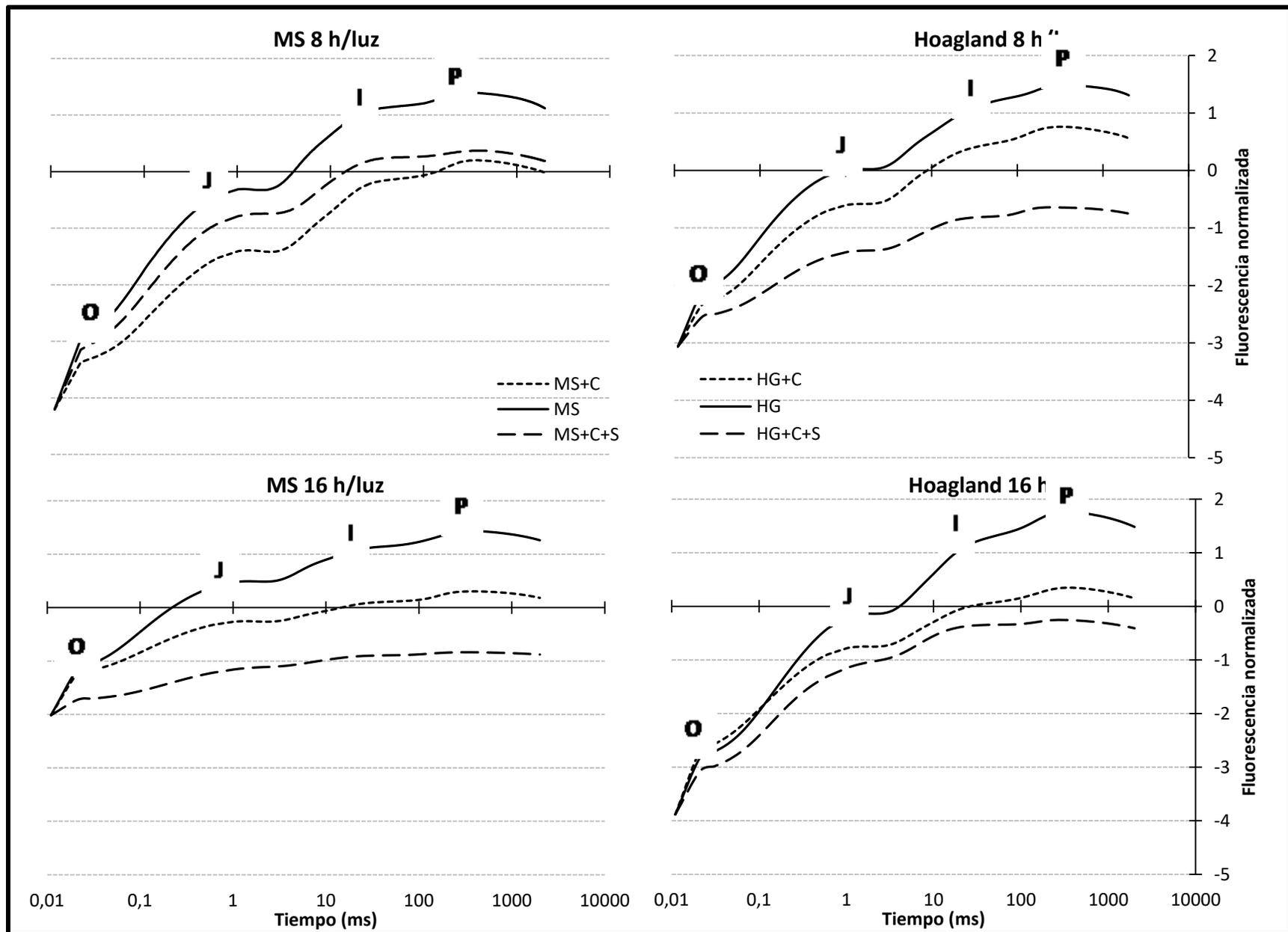


Figura 15. Comportamiento del PSII de *S. tuberosum* L. var alpha en el día 10 mediante curvas de inducción de fluorescencia de clorofila a (fase rápida OJIP). **O**: Fluorescencia mínima (F_0). **J**: Reducción parcial de Q_A . **I**: Reducción parcial de Q_B . **P**: Fluorescencia máxima (F_m).

5.5 Flujos específicos por centro de reacción y eficiencias cuánticas.

El análisis de los resultados obtenidos para eficiencias cuánticas (relaciones de flujo) muestran que no existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) para el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (F_m/F_v o ϕ_{Po}) como se muestra en las figuras 16, 17 y 18.

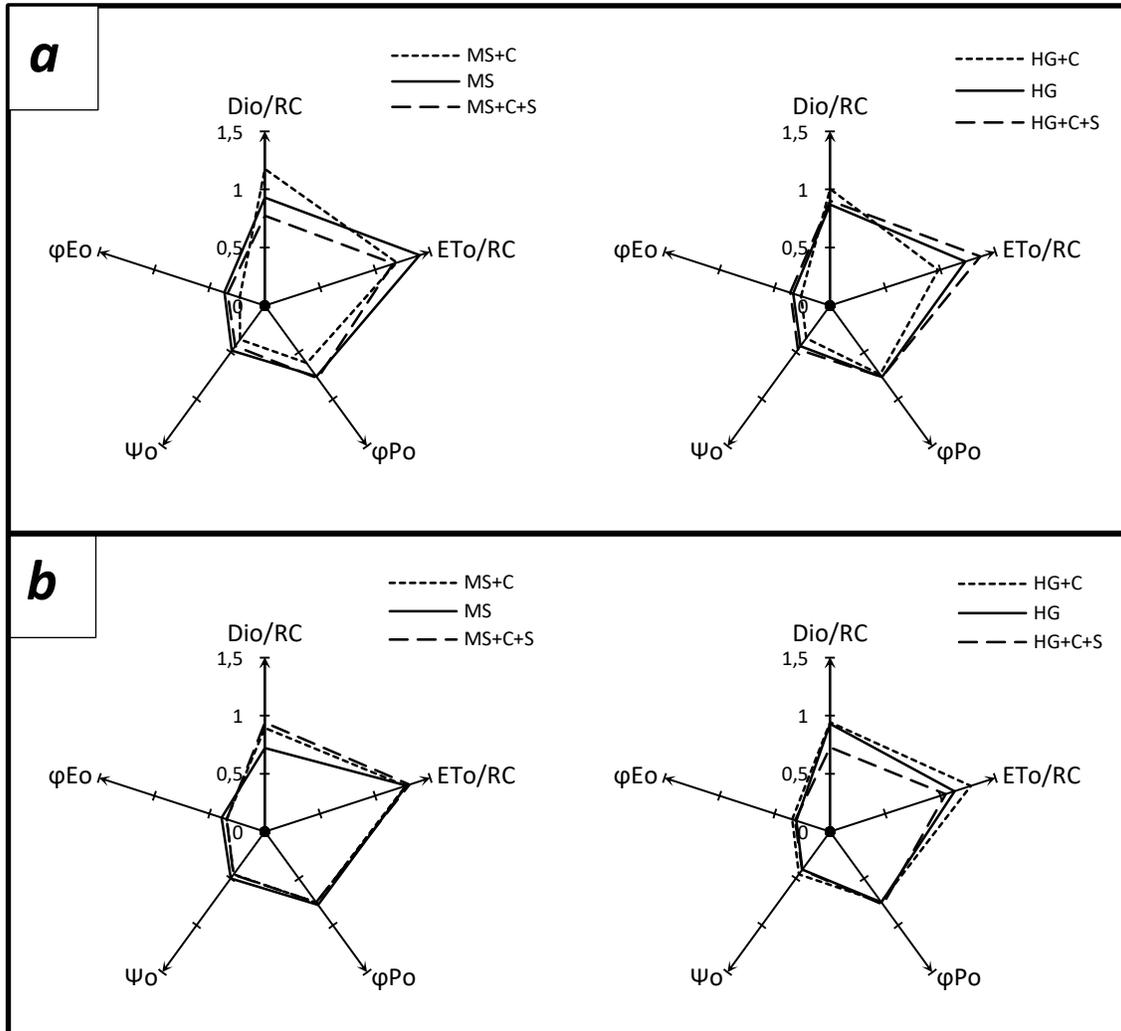


Figura 16. Comparación de flujos específicos por centro de reacción y eficiencias cuánticas de *S. tuberosum* L. var. alpha al día 0 en medio MS y Hoagland. **a.** Fotoperiodo corto (8 h/luz); **b.** Fotoperiodo largo (16 h/luz). Promedio $n=3$.

Por el contrario si se muestra diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q_A . (Ψ_o) donde las plantas pertenecientes al medio **MS+C** en el fotoperiodo corto (Fig. 16-a) resultaron presentar una $\Psi_o=0.36$, estadísticamente menor con respecto a los demás tratamientos (**MS** $\Psi_o=0.48$, **MS+C+S** $\Psi_o=0.44$), de la misma forma para el día 6 de mediciones en el mismo fotoperiodo el medio **MS+C+S** (Fig 17-a) presentó una disminución de dicho valor con respecto al día 0 y a los tratamientos utilizados esta disminución fue de $\Psi_o=0.44$ a $\Psi_o=0.34$.

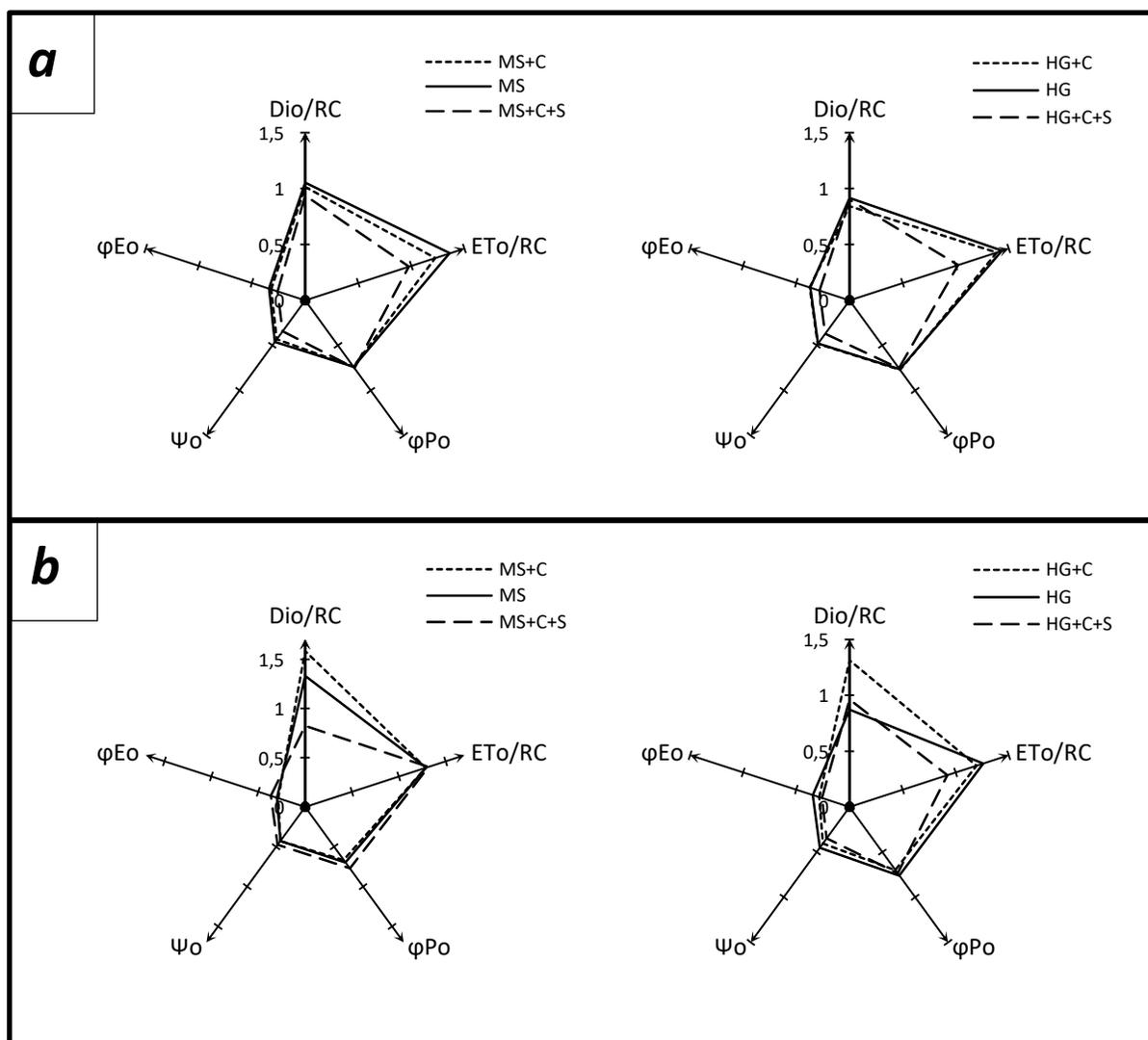


Figura 17. Comparación de flujos específicos por centro de reacción y eficiencias cuánticas de *S. tuberosum* L. var. alpha. al día 6 en medio MS y Hoagland. **a.** Fotoperiodo corto (8 h/luz); **b.** Fotoperiodo largo (16 h/luz). Promedio $n=3$.

En cuanto a la probabilidad de que un excitón mueva un electrón después de Q_A (Φ_{E_0}) se observa una disminución de dicho valor para el medio MS+C al comienzo de las mediciones en el fotoperiodo corto 8 h/luz en comparación con los demás medios. Durante el día 6 se observó una disminución en Φ_{E_0} para el medio MS+C+S en el fotoperiodo corto.

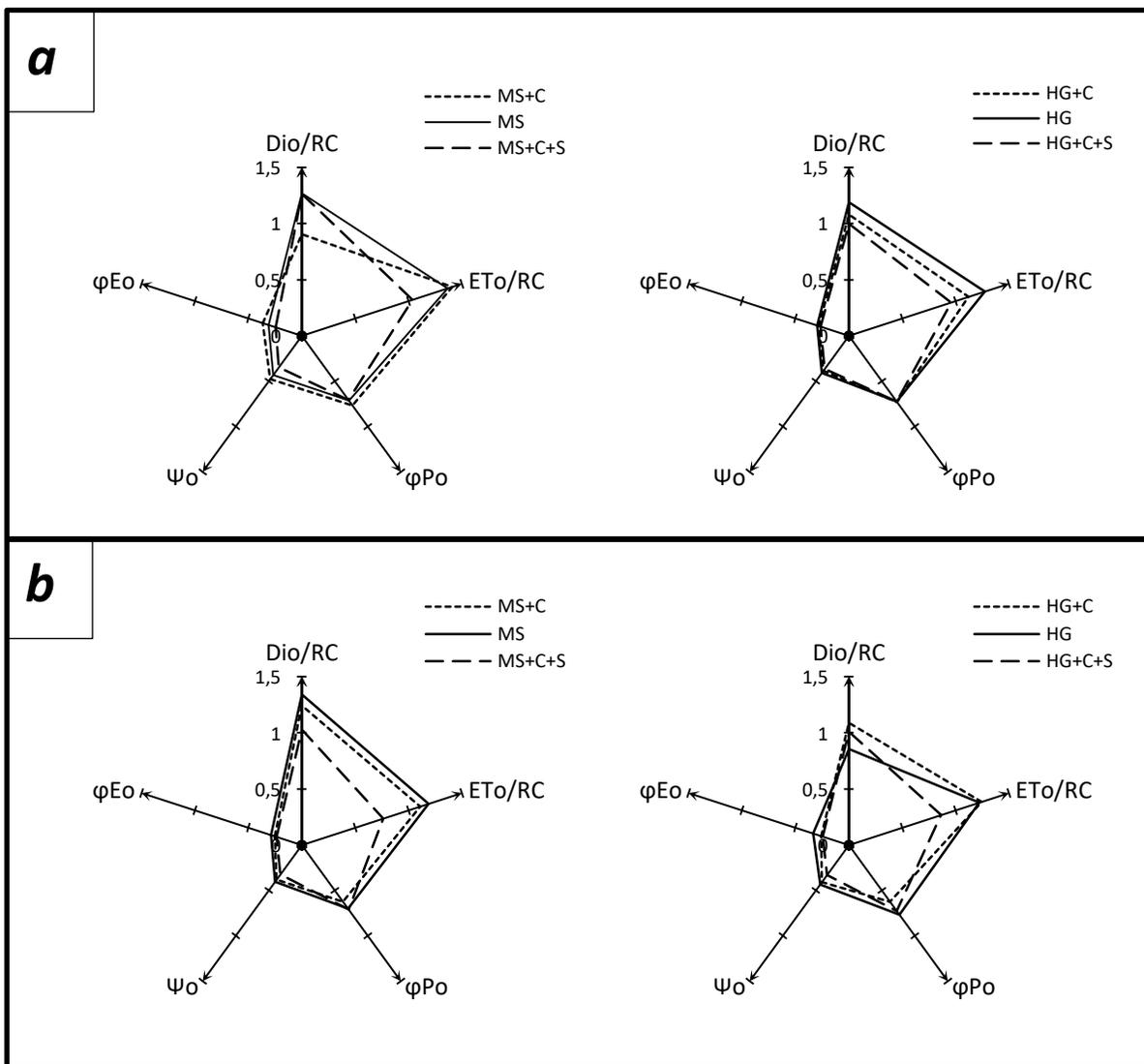


Figura 18. Comparación de flujos específicos por centro de reacción y eficiencias cuánticas de *S. tuberosum* L. var. alpha. al día 10 en medio MS y Hoagland. **a.** Fotoperiodo corto (8 h/luz); **b.** Fotoperiodo largo (16 h/luz). Promedio $n=3$.

Para los valores obtenidos de los flujos específicos por centro de reacción no se encontraron diferencias significativas en el transporte electrónico (ETo/RC) entre los distintos medios utilizados, sin embargo existió una diferencia significativa entre el día 0 y 10 de los medios **MS+C+S** y **HG+C+S** los cuales aumentaron significativamente ($P < 0.05$); y en cuanto a la disipación a tiempo 0 por centro de reacción (Dio/RC) esta presentó un comportamiento similar al transporte electrónico en el cual no se observan diferencias significativas entre los medios utilizados a excepción del día 0 en el cual se observa un aumento de la disipación para el tratamiento **MS+C** en el fotoperiodo corto (Fig. 16-a), pero se observa un marcado incremento de la energía disipada entre el día 0 y 10 de las mediciones realizadas.

Para los distintos fotoperiodos utilizados no se mostraron diferencias significativas excepto las ya antes mencionadas, el comportamiento de las variantes del medio Hoaglan y MS es muy similar entre sí sin importar los fotoperiodos utilizados las plantas responden de manera muy similar tal como se muestra en los gráficos anteriores.

6. Discusión.

6.1 Formación de los tubérculos

La tuberización de *S. tuberosum* L. var. alpha en presencia de la hormona cinetina para los medios **MS+C** y **HG+C** y la ausencia del mismo fenómeno en los controles negativos **MS** y **HG** resultan indicativo de que cinetina (3 mg/L) juega un papel importante para la formación del tubérculo y que esta no se encuentra ligada a la presencia de sacarosa en el medio, esta respuesta resulta contraria a lo que se tenía reportado para este proceso (Hoque, 2010) en el cual se apunta como indispensable el contenido de sacarosa en conjunto con la hormona para el comienzo de la formación del tubérculo en cultivos *in vitro*, no obstante en dichos trabajos no se tomó en cuenta la intensidad lumínica suficiente en este caso de $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y el correcto desarrollo de hojas que se presentó en esta investigación para que la planta fuese capaz de sintetizar su propia fuente de carbono (Figura 5). Por otra parte las plantas pertenecientes a los tratamientos (**MS+C**, **MS+C+S**, **HG+C** y **HG+C+S**) del fotoperiodo corto (8 h/luz) tuberizaron en el día 8 posterior a la aplicación de la hormona, en comparación con los mismos tratamientos en el fotoperiodo de 16 h/luz, los cuales mostraron crecimiento de tubérculos hasta el día 10, confirmándose con ello que los fotoperiodos cortos favorecen el inicio de la formación del tubérculo en papa (Jackson 1999).

6.2 Peso fresco.

Respecto a la cuantificación del peso fresco se mostró que las plantas que se cultivaron bajo fotoperiodos de 16 h/luz en los medios **MS** y **HG** exhiben un mayor aumento de peso fresco durante los primeros 10 días de mediciones considerando que sus valores iniciales se encontraron siempre por arriba de los 0.19 mg valor superior al presentado por las demás plantas crecidas bajo ambos fotoperiodos (Fig.8), dicha diferencia entre fotoperiodos se mantiene durante los 20 días para el medio **HG**, sin embargo en el medio **MS** la diferencia existente entre los pesos frescos de acuerdo al fotoperiodo desaparece por el pronunciado aumento de peso del tratamiento en un fotoperiodo corto, a pesar de que dicho tratamiento no

logra tuberizar en ambos fotoperiodos, el aumento de peso se da en una proporción similar a la de los tratamientos que formaron un tubérculo.

Por otro lado en los tratamientos **MS+C+S**, **MS+C**, **HG+C+S** y **HG+C** dicho aumento en el peso fresco posterior al día 10 estaría relacionado con el aumento de la biomasa en la planta para la generación del tubérculo mediante la síntesis y deposición de carbono y nitrógeno asimilados suficientes para su crecimiento y posterior síntesis de almidón y nitrógeno asimilados en el tubérculo (Sonewald y Uwe, 2014), sin embargo no se observaron diferencias significativas del peso fresco entre el medio Hoagland y MS para el cultivo *in vitro* de *S. tuberosum* L. var alpha, ya que cada medio utilizado reacciono de forma similar, además de mostrar curvas de inducción de fluorescencia a la clorofila *a* con la misma cinética por lo que es posible asegurar que la utilización de la solución nutritiva Hoagland para el cultivo *in vitro* de papa resulta igual de eficiente que la utilización del medio MS.

6.3 Cuantificación de almidón en hoja

La mayor acumulación de almidón en hoja se presentó en las plantas mantenidas en un fotoperiodo de 8 h/luz, esto puede deberse a que, como lo apunta Jackson (1999), una disminución en el fotoperiodo que recibe la planta en conjunto con un elevado flujo fotónico, como el que se mantuvo para las condiciones de este experimento ($300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), resultan en una mayor asimilación de CO_2 por unidad de biomasa seca foliar lo que provoca un incremento en la acumulación de almidón foliar durante el día.

Las mediciones realizadas en el día 20, posterior a la tuberización en los diferentes tratamientos muestran una disminución en la presencia de almidón en hoja, dicha disminución solo se muestra para el fotoperiodo 8 h/luz y en los medios **MS**, **MS+C**, **HG**, **HG+C+S** y **HG+C** contrario a ello el tratamiento **MS+C+S** y los grupos que permanecieron en un fotoperiodo largo mostraron un incremento en la cantidad de almidón presente en hoja, la disminución mencionada anteriormente surgió posterior al fenómeno de tuberización lo que podría indicarnos el hecho de que existe una traslocación del carbohidrato desde las

hojas hacia las zonas de brotación del tubérculo durante su formación (Coleman 1987; Sonnewald 2001; Börnke *et al.*, 2007), aunque la disminución de las concentraciones de almidón en hoja para los controles negativos de la tuberización (**HG** y **MS**) podría deberse a la utilización de esta fuente de carbono para el correcto desarrollo de la planta y crecimiento de la misma debido a una ausencia de sacarosa en el medio.

Para el caso de las variaciones en las concentraciones de almidón presentados para el fotoperiodo largo en los controles negativos de la tuberización (**HG** y **MS**) dichas variaciones no resultan estadísticamente significativas, sin embargo existe un marcado cambio en los tratamientos **HG+C** y **MS+C** los cuales muestran un aumento en la cantidad de almidón acumulada al día 20 (fig. 9), 0.305 mg y 0.22 mg respectivamente, dicha acumulación podría estar relacionada con la cantidad e intensidad de horas luz recibida por la planta para este fotoperiodo además de que se ha señalado que en condiciones de cultivo *in vitro* que carecen de una fuente externa de sacarosa como en el caso de estos tratamientos la planta desarrolla habilidades fotosintéticas mayores que aquellos que reciben un suministro de sacarosa (Demo *et al.*, 2008 y Kubota, 2001), por lo que bajos niveles de carbohidratos aumentan la expresión de genes para la fotosíntesis, movilización de reservas, procesos de exportación y síntesis o degradación de almidones (Koch, 1996).

La presencia de sacarosa en ambos medios MS y Hoagland (**MS+C+S** y **HG+C+S**) indujo la acumulación de una elevada cantidad de almidón en hoja siendo este valor mayor, en proporción con los medios que no contuvieron sacarosa, dicho aumento podría estar relacionado a que la planta no requiere una gran movilización de la reserva de almidón pero si de una buena capacidad en la síntesis de sacarosa que debe ser transportada para el crecimiento de los brotes cumpliendo con la demanda de energía, por lo que en caso de existir sacarosa en el medio la traslocación del almidón es evitada (Viola *et al.*, 2007), es decir que debido a la presencia de sacarosa en el medio la planta no necesita para su

desarrollo del almidón almacenado al recibir por medio de la sacarosa el aporte necesario de carbono.

6.4 Cuantificación de clorofila “a” y “b” en hoja.

En general todas las variantes de los medios utilizados mostraron una reducción en la cantidad de clorofila *a* en hoja para la última medición realizada, sin embargo el control positivo para la tuberización en el medio MS (**MS+C+S**) correspondiente al grupo en fotoperiodo 8 h/luz aumento su concentración de clorofilas posterior a los 20 días transcurridos, dicha disminución en la cantidad de clorofila *a* y la relación *a/b* presentada en el resto de los tratamientos ha sido reportada en otras especies de plantas vasculares en presencia de cinetina en concentraciones mínimas de $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Pazurkiewicz-Kocot, *et al.* 2011). De igual forma se ha señalado en previas investigaciones que existe una relación entre las concentraciones de clorofila en hoja y la presencia de sacarosa en el medio señalando que existe una correlación entre ambas y que mientras más limitante sea la concentración de sacarosa la cantidad de clorofila cuantificada se ve disminuida ya sea por el agotamiento de ésta debido al consumo que realiza la planta del medio o que las reservas no sean suficientes en la planta, de igual forma esto podría estar relacionado con el agotamiento de CO_2 dentro del recipiente (Langford y Wainwright, 1987).

De igual manera para las plantas pertenecientes a un fotoperiodo de 16 h/luz se observó de manera general una disminución en la relación de clorofila *a/b* (Fig. 11), aumentando dicha relación únicamente en los medios que contuvieron sacarosa **HG+C+S** y **MS+C+S** pertenecientes al fotoperiodo 16 h/luz al igual que en el medio **HG+C** correspondiente al fotoperiodo 8 h/luz, respecto a ello se sabe que esta relación de peso entre clorofila *a/b* es un indicador del equipamiento del pigmento funcional con el que cuenta el tejido y la adaptación luminosa del aparato fotosintético (Lichtenthaler, *et al.*, 1981; Lichtenthaler, 2001) por lo que la relación y cantidad de clorofilas cuantificadas en esta investigación podría estar relacionada con los fotoperiodos utilizados; sin embargo se sugiere que valores elevados en la relación *a/b* podrían estar asociados con el reverdecimiento de

hojas etioladas u hojas maduras que alcanzan su desarrollo completo (Linchtenthaler, 2001), sin embargo también se ha apuntado que una disminución entre esta relación de clorofila *a/b* como la observada en el presente estudio puede surgir por la presencia en el medio de concentraciones mínimas de la hormona cinetina (Pazurkiewicz-Kocot, *et al.*, 2011)

La cuantificación de clorofila *b* (Fig. 12) no muestra diferencias significativas para el día 0 entre ambos fotoperiodos, la respuesta de las plantas en los distintos medios, idénticos entre sí pero en distintos fotoperiodos, resulto con cantidades de clorofila en hoja muy similares. Para el caso de las plantas en los medios con sacarosa **MS+C+S** y **HG+C+S** se presentó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la clorofila *b* en el día 20 con respecto al día 0, de la misma manera existen diferencias significativas entre éstos dos medios, donde se mostró una mayor cantidad de clorofila *b* acumulada en hoja (0.081 mg/g de tejido fresco, ± 0.02) en el medio **HG+C+S** para el día 20 de las mediciones de las plantas pertenecientes al fotoperiodo 8 h/luz, pues se presenta un caso contrario en aquellas plantas mantenidas bajo el fotoperiodo largo (16 h/luz) las cuales mostraron una disminución de dicha clorofila transcurridos los 20 días del experimento (Fig 12-e). Los medios restantes (**MS**, **MS+C**, **HG** y **HG+C**) mostraron una disminución estadísticamente significativo da la cantidad de clorofila cuantificada al día 20 esto en el fotoperiodo de 8 h/luz, dichos aumentos en de la clorofila *b* en presencia de sacarosa y cinetina estarían corroborando que la presencia de ambos factores influyen en el aumento o disminución de dicho pigmento tal como se ha apuntado en investigaciones previas para otras especies de plantas vasculares (Langford y Wainwright, 1987; Pazurkiewicz-Kocot, *et al.*, 2011).

6.5 Inducción de fluorescencia de clorofila a (fase rapida OJIP).

La uniformidad de la curva OJIP presentada al comienzo de las mediciones podría ser indicativo de que existieron las mismas condiciones de cultivo para todos los tratamientos y que la respuesta a la utilización de ambos medios Hoagland y MS resulta indistinta, pues mediante la medición de fluorescencia resulta posible evidenciar la influencia que tienen diversos factores asociados al cultivo de una planta en la fotosíntesis de la misma brindando información sobre la eficiencia

fotoquímica en el fotosistema II y la disipación térmica de la energía absorbida por los complejos antena (Maxwell y Johnson 2000). La cinética de todo el gráfico se desarrolla entre los 0.01 ms momento en el cual los centros comienzan a reducirse después de estar oxidados por un pre-acondicionamiento a la obscuridad y hasta los 1000 ms tiempo cercano en el cual las curvas OJIP pertenecientes a *S. tuberosum* alcanzan F_0 y comienza el decaimiento de la fluorescencia. La letra correspondiente a “J” representa la reducción parcial de la quinona “A” (Q_A), mientras que “I” representa la reducción parcial de Q_A a Q_B , quedando “P” como el valor máximo de la fluorescencia también conocido como F_m (González *et al.*, 2008).

La cinética de la fluorescencia en el día 6 (fig. 13) previa a la formación del tubérculo se observó para el caso de las variantes del medio MS que en la presencia de cinetina existe una disminución de la eficiencia fotosintética, observable con el aumento de la fluorescencia para ambos fotoperiodos (8 h/luz y 16 h/luz). Con respecto a los grupos que contenían cinetina en el medio (MS+C y MS+C+S) dicha inhibición de la actividad fotosintética ha sido descrita con anterioridad debido al suministro de esta citocinina provocando una disminución del flujo de electrones en torno a la fase J de la curva OJIP sin que esta llegue a interrumpir completamente el funcionamiento del fotosistema II (Paz, 2014). Para ambos fotoperiodos es posible observar una disminución en la fluorescencia emitida en los grupos MS+C y MS+C+S en el comienzo de la tuberización con respecto al grupo MS, la disminución de la fluorescencia durante los días posteriores a la formación del tubérculo (fig. 15), es traducida como un aumento de la eficiencia fotosintética, es decir que existe una gran proporción de centros de reacción oxidados aumentando la eficiencia fotoquímica (González *et al.*, 2008), de igual forma para las plantas pertenecientes al fotoperiodo 16 h/luz existe una inhibición del PSII que es visible con el aumento de “O” correspondiente al valor mínimo de la fluorescencia (F_0) (Brestic y Zivcak, 2012).

Para el caso de los resultados obtenidos con la solución nutritiva Hoagland en el día 6 se observa un comportamiento distinto en la curva OJIP al observado en el

medio MS, las plantas con un fotoperiodo 8 h/luz que contenían cinetina (**HG+C**) mostraron valores muy similares al control negativo (**HG**) no obstante el medio **HG+C+S** mostro una disminución en la fluorescencia emitida la cual se traduce como un aumento en la eficiencia fotosintética (Brestic y Zivcak, 2012; González *et al.*, 2008), este resultado fue contrario a lo observado en las plantas con MS en el cual el medio de cultivo **MS+C+S** disminuye su eficiencia fotosintética. En cuanto a las plantas que permanecieron en un fotoperiodo de 16 h/luz el tratamiento **HG+C** mostro un comportamiento muy similar al tratamiento **MS+C** mostrando una emisión de fluorescencia mayor a la del control negativo (**HG** y **MS** respectivamente), es decir que también existe una inhibición de la actividad fotosintética con la presencia de cinetina (Paz, 2014; Zerbe y Wild, 1980; Alla, *et al.*, 2001; Shah, 2011). Sin embargo con la presencia de sacarosa en el medio al igual que en el fotoperiodo corto durante el fotoperiodo largo el control positivo (**HG+C+S**) se mantiene por debajo del control positivo en cuanto a la fluorescencia emitida lo cual se traduce como en una mejor eficiencia fotosintética al encontrarse una mayor cantidad de centros de reacción oxidados (González *et al.*, 2008).

6.6 Flujos específicos por centro de reacción y eficiencias cuánticas.

El rendimiento cuantico de la fotoquímica primaria (F_v/F_m o ϕ_{P_0}) es un parámetro aplicado con frecuencia como indicador de alguna fotoinhibición o lesión causada a los componentes del PSII, por lo que dicho valor se presenta constante en la mayoría de las especies de plantas (Brestic y Zivcak, 2012) tal y como se observó a lo largo de este experimento en el cual no existieron diferencias significativas entre los fotoperiodos y medios utilizados en plantas de *S. tuberosum* var. alpha, se apunta también que en plantas dañadas o bajo algún estrés la relación F_v/F_m se reduce notablemente (Pfündel, 1998; Franck *et al.*, 2002; Toth *et al.*, 2007).

En cuanto a la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón más allá de Q_A (Ψ_0) se observa una clara disminución de este flujo en las plantas con el tratamiento **MS+C+S** (Fig. 17-a) perteneciente al fotoperiodo corto, dicha disminución del flujo fotonico es observable previa a la tuberización es decir durante

los primeros 6 días de mediciones, lo cual está relacionado con lo observado en la figura 14 donde para este tratamiento existe un gran aumento de los valores de la curva OJIP y concuerda con lo apuntado por Paz (2014) para *S. tuberosum* el cual indica en esta especie una inhibición parcial del PSII con la presencia de la hormona cinetina. A su vez el valor de Ψ_o está relacionado enteramente con la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A pues este resulta de la relación existente entre el transporte electrónico (ETo) y la absorción (ABS) de los complejos antena (González *et al.*, 2008) por la las disminuciones antes mencionadas para (Ψ_o) continúan presentes en Φ_{Eo} .

A pesar de lo anterior los valores para el transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción permanecieron sin cambios estadísticamente aparentes entre los distintos medios utilizados pero si se evidenciaron diferencias entre el día 0 y 10 donde los medios **MS+C+S** y **HG+C+S** los cuales presentaron un aumento significativo ($P < 0.05$) el cual podría estar directamente relacionado con el aumento en las eficiencias fotosintéticas como se observó en la figura 15.

En el caso de la Dio/CR no se presentaron diferencias significativas entre ambos fotoperiodos (8 h/luz y 16 h/luz), sin embargo existen diferencias significativas entre el día 0 y día 10 de mediciones donde la Dio/CR aumenta considerablemente en comparación con el comienzo de las mediciones, en el caso particular de las plantas con variantes del medio MS que se encontraron en el fotoperiodo 16 h/luz mostraron una disminución en la eficiencia fotosintética (Fig. 14) esta disminución está siendo evidente con el aumento de la Dio/CR (Fig. 18) los aumentos de Dio/CR indican la proporción de energía escapada como calor o transferida a otros sistemas no fluorescentes (González *et al.*, 2008; Brestic y Zivcak, 2012) lo cual explicaría la disminución de la eficiencia fotosintética al existir una mayor cantidad de energía disipada, algo similar se observa en el medio **HG+C** para el día 10 en un fotoperiodo de 16 h/luz el cual en comparación de los medios **HG** y **HG+C+S** aumento para ese día el valor de F_o lo que se traduce como una ligera disminución de la eficiencia fotosintética (Fig 14).

7. Conclusiones.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante esta investigación es posible concluir lo siguiente:

La aplicación de cinetina en concentraciones de 3 mg/L provoca la inhibición de la eficiencia fotosintética en el PSII previa a la tuberización. Mientras que esta eficiencia fotosintética se ve claramente favorecida marcando el comienzo de la formación del tubérculo.

La presencia de la hormona cinetina (3 mg/L) resulta determinante para la formación del tubérculo en *S. tuberosum* L. var. alpha, mientras que la presencia de sacarosa en el medio es imprescindible para que exista formación del tubérculo.

La utilización de la solución nutritiva Hoagland en cultivo *in vitro* de papa resulta igual de eficiente que la utilización del medio MS, además de que ambas en forma líquida promueven el desarrollo de hojas.

La utilización de un fotoperiodo 8 h/luz, en combinación con un flujo fotónico de $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ induce una mayor acumulación de almidón en hoja para plantas de *S. tuberosum* L. var. alpha favoreciendo el tiempo de tuberización.

8. Referencias.

- Abelenda, J.A., Navarro, C. y Prat, S. 2011. From the model to the crop: genes controlling tuber formation in potato. *Curr. Opin. Binol.* 22: 287-297.
- Akbar, I.A., Qhrmanzadeh, R., Azimi, J. y Janpoor, J. 2010. The Effect of Various Concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) and Sucrose on in Vitro Potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtuber Induction. *Am-Euras. J. Agric. & Env. Sci.* 8(4): 457-459.
- Akita, M. y Takayama, S. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell. Rep.* 13: 184-187.
- Albany, V.N.R., Vilchez, P.J.A., León, S.S., Nava, F.A.R., Martínez, F.L.J. y Molina, P.M.A. (2015). Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill). *Rev. Colomb. Biotec.* 1, 24-31.
- Alla, N.M.M., Younnis, M.E., El-Shihaby, O.A. y El-Bastawisy, Z.M. 2001. Effect of kinetin on photosynthetic activity and carbohydrate content in waterlogged or seawater treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *J. of Biol. Sci.* 1(10): 918-924.
- Appeldoorn, N.J.G., De Bruijn, S.M., Koot-Gronsveld, E.A.M., Visser, R.G.F., Vreugdenhil, D. y Van der Plas, L.H.W. 1999. Developmental changes in enzymes involved in the conversion of hexose phosphate and its subsequent metabolites during early tuberization of potato. *Plant. Cell. Env.* 22:1085–1096.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiol.* 24:1-15.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2013. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. España. 165-223 Pp.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. y Stryer, L. 2008. *Biochemistry*. Reverté. España. 548-563 Pp.

- Börnke, F., Sonnewald, U. y Biemelt, S. 2007. Potato. In: Pua EC, Davey MR. Biotechnology in agriculture and forestry. Springer. Heidelberg. Pp. 297–315.
- Boguslaw, S., Elzbieta, D., Adam, S. y Andrzej S. 1994. Photometric starch-iodine determination in plant materials as influenced by ascorbic acid citrical remarks. Act. Soc. Bot. Pol. 63(1):49-52.
- Brack, W. y Frank, H. 1998. Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40: 34-41.
- Brestic, M. y Zivcak, M. 2012. PSII Fluorescence techniques for Measurement of Drought and High Temperature Stress Signal in Crop Plants: Protocols and Applications. Molecular Stress Physiology of Plants. Springer. EUA. 87-131 pp.
- Cañal, M.J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sanchez-Tames, R. y Majada, J.P. 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. Biot. Veg. 1: 3-9.
- Carrera, E., Bou, J., Garcia-Martinez, J.L. y Prat, S. 2000. Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. Plant J. 22:247–256.
- Claassens, M.M.J. y Vreugdenhill, D. 2000. Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation ?. Pot. Resch. 43: 347-369.
- Coleman, W.K. 1987. An evaluation of bromoethane for breaking tuber dormancy in *Solanum tuberosum* L. Am Potato J. 60:161–167.
- CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad). 2011. [En Línea]. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. [Fecha de consulta: 15 de marzo del 2016]. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20914_sg7.pdf
- Coenen, C. y Lomax, T.L. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. Trends in P. Sci. 2(9): 351-356.

- Demo, P., Kuria, P., Nyende, A.B. y Kahangi, E.M. 2008. Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). African J. of Biot. 7(15):2578-2584.
- Etienne, H. y Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. P. Cell, Tiss. & Org. Cult. 69: 215-231.
- Etienne, E., Teisson, C., Alvard, D., Lartaud, M., Berthouly, M., Georget, F., Escalona, M. y Lorenzo, J.C. 1999. Temporary immersion for plants tissue culture. Plant Biotechnology and *In vitro* Biology in the 21st Century. Kluwer Academic Publishers. Israel. 629-632 pp.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2008. [En Línea]. Año internacional de la papa (AIP). Pesquero: Panorama de la Papa. [Fecha de consulta: 23 de marzo del 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/cultivo.html>
- Ferreira, S.J., Senning, M., Sonnewald, S., Kessling, P.M., Goldstein, R. y Sonnewald, U. 2010. Comparative transcriptome analysis coupled to X-ray CT reveals sucrose supply and growth velocity as major determinants of potato tuber starch biosynthesis. BMC Genomics. 1:93.
- Fráguas, B.C., Pasqual, M. y Pereira, R.A. 2004. *In vitro* multiplicación of *Ficus carica* L.: kinetin and giberelic acid effects. Ciênc. Agrotec. Lavras. 28(1):49-55.
- Franck, F., Juneau, P., Popovic, R. 2002. Resolution of photosystem I and photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. Biochim. Biophys. Acta. 162: 239-246.
- González Moreno, S., Hugo, P.V. y Marta, O.S.A. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. REB. 27, 119-129.
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station. The College of agriculture University of California, Berkeley. E.U.A. 4-32 Pp.
- Hoque, M.E. 2010. *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Omics J. 3(1):7-11.

- Howell, H.S., Lall, S. y Che, P. 2003. Cytokinins and shoot development. *Plant Science*. 8(9): 453-459.
- Jackson, S.D. 1999. Multiple Signaling Panthways Control Tuber Induction in Potato. *Plant Physiol*. 119:1-8.
- Jordán, M. y Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena. Chile. Pp. 2-28.
- Kloosterman, B., Vorst, O., Hall, R.D., Visser, R.G.F. y Bachem, C.W. 2005. Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant. Biotec. J*. 3:505–519.
- Kloosterman, B., Navarro, C., Bijsterbosch, G., Lange, T., Prat, S., Visser, R.G. y Bachem, C.W. 2007. StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development. *Plant J*. 52:362–373.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annual Rev. of P. Phys. and P. Molec. Biol*. 47: 509-540.
- Kubota, C., Kakizaki, N., Kozai, T., Kasahara, K., y Nemoto, J. 2001. Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. *HortSci*. 36:49-52.
- Langford, P.J. y Wainwright, H. 1987. Effects of Sucrose Concentration on the Photosynthetic Ability of Rose Shoot *In Vitro*. *Annals of Botany*. 60: 633-640.
- Lichtenthaler, H.K. y Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. Wiley. E.U.A. F4.3.2-F4-3.8 pp.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H.J., Bach, T., Kozel, U. y Rahmsdor, U. 1981. Photosynthetic activity chloroplast ultrastructure and leaf characteristics of hight-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth. Res*. 2: 115-141.
- Maxwell, K. y Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J Exp Bot*. 51, 659-668.
- Miller, O.C. 1956. Similarity of some kinetine and red light effects. *Plant. Physiol*. 1:318-319.

- Mok, D.W.S y Mok M.C. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 89-118.
- Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-496.
- Ortiz, L.Y. y Flórez, V.J. 2008. Comparación cuantitativa de ácido abscísico y citocininas en la tuberización de *Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. *et* Buk. *Agrom. Colomb.* 26: 32-39.
- Osborne, J.D. 1962. Effect of Kinetin on Protein & Nucleic Acid Metabolism in Xanthium Leaves During Senescence. *Plant Physiology.* 1:595-602.
- Pazurkiewicz-Kocot, K., Kita, A. y Haduch, A. 2011. The effect of kinetin on the chlorophyll pigments content in leaves of *Zea mays* L. seedlings and accumulation of some metal ions. *Inżynieria i Ochrona Środowiska.* 14(4): 397-409.
- Paz, S.A. 2014. Efecto de inhibidores del transporte electrónico fotosintético sobre la atuberización de *Solanum tuberosum* var. alpha. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Pereira, R.A., Pereira de Carvalho, S., Pasqual, M. y Carvalho, S.F. 2007. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaia cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. *Ciênc. agrotec.* 31(2): 332-336.
- Pfündel, E. 1998. Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 56: 185-195.
- Raven, H.P., Evert, F.R. y Eichhorn, E.S. 1992. *Biología de las plantas.* Reverté. E.U.A. 481-487 pp.
- Rivera-Domínguez, M. 2006. La biotecnología en plantas y aspectos biotecnológicos del mango. *Interciencia.* 30(2):95-100.

- Rodríguez-Pérez, L. 2010. Ecofisiología del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) Rev. Col. De Cien. Hort. 4(1):97-108.
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion. 2010. [En Línea]. Papa. [Fecha de consulta: 23 de febrero del 2016]. Disponible en:
http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=230&Itemid=427.
- Shah, S.H. 2011. Kinetin improves photosynthetic and antioxidant responses of *Nigella sativa* to counteract salt stress. Russian J. of Plant Physiol. 58(3): 454-459.
- SHCP (Secretaria de Hacienda y Crédito Público). 2014. [En Línea]. Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero: Panorama de la Papa. [Fecha de consulta: 19 de febrero del 2016]. Disponible en:
<http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Papa%20%28abr%202014%29.pdf>
- Smith, P.M. y Atkins, C.A. 2002. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. Plant Physiol. 128: 793-802.
- Sonnewald, U. 2001. Control of potato tuber sprouting. Trends Plant Sci. 6:333–335
- Sonnewald, S. & Uwe, S. 2014. Regulation of potato tuber sprouting. Planta. 239:27-38.
- Suttle, J.C. 2001. Dormancy related changes in cytokinin efficacy and metabolism in potato tubers during postharvest storage. J. plant Growth Reful. 35: 199-206.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Vol. 1. Editorial Publicacions de la Universitat Jaume I. España 137-282 Pp.
- Takushi, T., Toyozato, T., Kawano, S., Taba, S., Ooshiro, A., Numazawa, M. y Tokeshi, M. 2007. Starch method for simple, rapid diagnosis of citrus

- huanglubing usin iodine to detect high accumulation of starch in citrus leaves. *Ann Phytopathol. Soc. Japan.* 73: 3-8.
- Torres, C.A., Duval, D.F., Ribeiro, G.D., Barros, F.F.A. & Aragão, A.D.F. 2005. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenine e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. *Hort. Brasileira.* 23(3):789-792.
- Toth, S.Z., Schansker, G., Kissimon, J., Kovacs, L., Garab, G. y Strasser, R.J. 2005. Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* 162: 181-194.
- Viola, R., Pelloux, J., Van Der Ploeg, A., Gillespie, T., Marquis, N., Roberts, G.A. y Hancock, D.R. 2007. Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant, Cell and Environment.* 30: 973-983.
- Visser, R.G.F., Vreugdenhil, D., Hendriks, T. y Jacobsen, E. 1994. Gene expression and carbohydrate content during tuber to stolon transition in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75:525–531.
- Watkinson, J.I., Lori H., Allan A.S., Lenwood, S.H., Hans J.B. y Ruth G. 2008. Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *Andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiol. & Biochem.* 46:34-45.
- Xu. X., Vreugdenhil. D. y Van Lammeren, A.A.M. 1998. Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *J Exp. Bot.* 49:573–582.
- Zerbe, R. y Wild, A. 1980. The effect if kinetin on the photosynthetic apparatus of *Sinapsis alba*. *Photosynth. Resch.* 1: 53-64.