



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LA CUMARINA 1, 2 BENZOPIRONA EN EL
CRECIMIENTO DE PAPA**

Solanum tuberosum var. Tollocan *in vitro*.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MONTSERRAT LÓPEZ CORIA

Director: DR. JUAN GERARDO ORTIZ MONTIEL



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México. 2013

Nuestras horas son minutos cuando esperamos saber,
y siglos cuando sabemos lo que se puede aprender.

A. Machado.

Agradecimientos

- **Al Dr. J. Gerardo Ortiz:**

Por la dirección de este trabajo, apoyo y enseñanzas a lo largo de la carrera. Gracias MAESTRO.

- **A mis sinodales Dr. Manuel Mandujano, Dr. Hugo Perales, M. en C. Alberto Arriaga y M. en C. Socorro Sánchez:**

Por las correcciones al presente y su atención brindada en todo momento.

- **Al Dr. Roberto Velasco y al Dr. Luis Barbo:**

Por su apoyo en la ejecución de métodos usados en este estudio.

- **A Yolanda Pozos, Rocío Reyero y Miguel Verástegui:**

Por su ayuda incondicional en el inicio de un largo camino.

- **A mis Padres y a Pedro López:**

Son la piedra angular de mi presente y futuro. A ustedes dedico este logro. Los quiero.

- **A Miguel A. Alcántara:**

Por ser paradigma en mi vida. Meta cumplida, gracias.

- **A mi familia:**

En especial a Vallín-Arriaga y Castillo-López, gracias por impulsarme en todo momento.

- **A mis amigos:**

Miriam, Fabiola, Paulina, Giovanni, Ivan, Gustavo, Marcos, Alejandro ... sin ustedes la universidad nada me hubiera enseñado.

Contenido

Abreviaturas	1
Introducción	2
<i>Solanum tuberosum</i>	4
El cultivo <i>in vitro</i>	5
Producción de microtubérculos <i>in vitro</i>	5
Tuberización	6
Inducción	6
Iniciación.....	7
Objetivos.....	9
General	9
Particulares.....	9
Materiales y métodos.....	10
Material vegetal y tratamientos.....	10
Crecimiento	10
Determinación de presencia de cumarina	10
Tuberización	11
Fluorescencia de la clorofila a	11
Concentración de Clorofila a y b.....	11
Resultados y discusión.....	13
Crecimiento	13
Determinación de la presencia de cumarina en plántulas.....	15
Porcentaje de tuberización.....	16
Análisis de fluorescencia	18
Concentración y proporción de clorofila a y b.	25
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29
Anexo I.....	40
Medio de propagación MS62 ajustado a papa Tollocan.	40
Solución A de elementos mayores	40
Solución B de elementos menores.....	40

Solución C	41
Pate orgánica	41
Anexo II	42
Anexo III	45

Abreviaturas

ABS	Flujo de fotones absorbidos
ABA	Ácido abscísico
Chla	Clorofila a
Chla/b	Relación de clorofila a/b
Chlb	Clorofila b
Cs	Parámetros fenomenológicos por sección cruzada
DI	Disipación de energía en forma de calor
ET	Flujo de transporte electrónico
Fm	Fluorescencia máxima
Fo	Fluorescencia mínima
GA's	Giberelinas
LHC-PSII	Antena del PSII
Pi/ABS	Índice de funcionamiento
PQ	Plastoquinona
PSII	Fotosistema II
PI _{ABS}	Índice de rendimiento
Q _A	Quinona A
Q _B	Quinona B
r/v	Índice vástago/raíz
RC	Centro de reacción
TR	Flujo de energía transferida al centro de reacción
ϕ_0	Eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria del fotosistema II.
ψ_0	Probabilidad o eficiencia de que un electrón se mueva después de Q _A ⁻

Introducción

Los metabolitos secundarios derivados del metabolismo en plantas, no presentan función definida en procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrimentos o síntesis de biomoléculas como los metabolitos primarios (Ávalos y Pérez, 2009). Además, presentan distribución restringida, ya que no todos están en todas las especies y se sintetizan en cantidades mínimas. Sin embargo, tienen funciones ecológicas en la pigmentación, polinización, atracción, repelencia, protección y defensa (Ávalos y Pérez, 2009) o bien, en la fenología como inhibidores o estimuladores de la germinación de las semillas y afectan o benefician el crecimiento de las plantas (Gálvez, 2001).

Una modalidad de dichas interacciones bioquímicas es la alelopatía, donde la interacción se da entre una especie donante sobre otra receptora (Rabotnikof *et al*, 2005). La alelopatía se define como cualquier proceso que involucra metabolitos secundarios de plantas que influyen en el crecimiento y desarrollo de los sistemas biológicos cercanos (Rzavi, 2011), difiere del fenómeno de la competitividad en que los mecanismos atrayentes entre los organismos involucrados, conllevan la adición de alguna sustancia química por una especie en el ambiente de otra, en vez de la remoción de un recurso ambiental (Ballester y Vieitez, 1978)

Las sustancias químicas con actividad alelopática pueden ser de diferente naturaleza, como terpenos, alcaloides, ácidos grasos y compuestos fenólicos que provienen del follaje o de raíces vivas, muertas o en proceso de descomposición (Gálvez, 2001).

Dentro de los compuestos fenólicos, se encuentran las cumarinas, un amplio grupo de lactonas del ácido *O*-hidroxicinámico (Abenavoli *et al*, 2003), que presenta la estructura de 2H-1-benzopirán-2-ona (Carretero, 2000). Se ha reportado que las cumarinas tienen efectos alelopáticos, por ejemplo, efectos adversos sobre el metabolismo energético de las plantas incluyendo la fotosíntesis. Estudios con piranocumarinas como esculetina y escopoletina han demostrado que suprimen la fotosíntesis de lenteja de agua (*Lemma minor* L.) disminuyendo el transporte de electrones a la misma concentración que se requiere para la inhibición del crecimiento de la planta (Einhelling, 1995). También se ha reportado el mismo efecto de la escopoletina sobre tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.) y sobre amaranto (*Amaranthus retroflexus* L.) (Calera *et al*, 1995).

En el caso de xalentina, otra piranocumarina que se aisló de la raíz de *Stauranthus perforatus* Lundell, se reportó su actividad como inhibidor de la reacción de Hill en cloroplastos aislados de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) (Macías *et al*, 1999).

En el estudio de los cambios en la fotosíntesis debidas a compuestos fenólicos, no se ha empleado la medición de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (PSII). El análisis de la emisión de fluorescencia hace posible caracterizar los efectos y modos de acción de diferentes tipos de estrés ambiental. Es un método que puede ser aplicado tanto *in situ* como *in vivo* y es sensible (González *et al*, 2008).

El compuesto más sencillo de las cumarinas es la cumarina 1,2 benzopirona (Figura 1), se ha reportado la actividad alelopática de este compuesto como inhibidor del crecimiento inducido por giberelinas, es antagónico a la actividad del ácido abscísico (ABA), provoca alteraciones en el contenido de agua en la planta (Blanco, 2006), es inhibidor de la germinación de semillas y el crecimiento de raíces (Abenavoli *et al*, 2003) y disminuye la tasa de fotosíntesis por inhibición del transporte de electrones (Moreland *et al*, 1987).

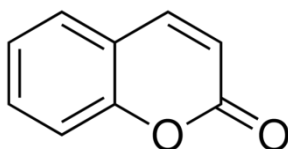


Figura 1. Estructura química de la cumarina 1,2 benzopirona. Fuente: www.sigmaaldrich.com

A concentraciones superiores a 200 μM (≈ 29.22 mg/l), la cumarina 1,2 benzopirona, inhibe la germinación de las semillas de trigo (*Triticum turgidum* ssp. *Durum* Desf.) inhibe la absorción de agua y retrasa la reactivación de peroxidasas por el aumento de la actividad de superóxido dismutasa (Abenavoli *et al*, 2006). Así mismo está involucrada en la diferenciación celular, actuando como regulador del crecimiento y afecta el metabolismo de auxinas (Abenavoli *et al*, 2001).

Es conocido que las malezas poseen sustancias alelopáticas como la cumarina (Pérez y Ormeño, 1991; Gómez *et al*, 2003) hecho que tiene gran importancia en agrosistemas ya que influyen en el éxito de las especies cultivadas.

Solanum tuberosum.

La papa es el cuarto cultivo más importante del mundo, solo detrás del trigo, maíz y arroz. En México, se sembraron 69,054.26 ha en el año 2011, colocando a la papa en el lugar quinceavo de 201 cultivos de riego y temporal y el sexto en valor de producción (SIAP, 2012). En la dieta mexicana ocupa el quinto lugar en consumo, lo que arroja 16.2 kg de consumo *per cápita* (Ochoa, 2012). El estado con mayor producción fue Sonora, seguido de Sinaloa y Veracruz (SIAP, 2012). El 64% de la superficie se siembra con variedades extranjeras como: Alpha con 40% de la superficie, Atlantic (7%), Mondial (5%) y Gigant (5%). Las variedades mexicanas se siembran en el 36% restante de la superficie cultivada, sobresaliendo: Rosita (15%), Marciana (6%), Tolloca (6%) y San José (5%) (Rubio *et al*, 2000; Ortiz, 1986). Se cultiva tanto en los ciclos primavera- verano (abril a septiembre), como en el de otoño-invierno (de octubre a marzo), bajo condiciones de temporal y riego respectivamente (Ochoa, 2012).

La papa o patata (*Solanum tuberosum*) pertenece a la familia Solanaceae. Tiene flores pentámeras, su tallo puede ser ramificado, hueco y triangular en sección transversal, las hojas son compuestas consistentes de un peciolo con foliolo terminal, foliolos laterales secundarios y a veces terciarios intersticiales. Las raíces de plantas que provienen de semilla sexual desarrollan raíces delgadas de donde salen las radículas laterales y las plantas que crecen directamente de tubérculos desarrollan raíces adventicias en los nudos del tallo y un sistema radical a una profundidad entre 40 a 50 cm. El tubérculo, engrosamiento del estolón, es la parte del tallo adaptado para el almacenamiento de reservas alimenticias y de reproducción (Rubio, *et al* 2000), el cual está cubierto por una exodermis que va engrosándose con el tiempo y aparece al romperse la epidermis. Sobre su superficie existen hundimientos para resguardar las yemas vegetativas que originan los tallos, que están dispuestos en forma helicoidal. Además, presentan orificios que permiten la respiración, llamados lenticelas. (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2012.)

Los tubérculos contienen almidón, vitamina B1, B2, B3, B5, B6 y C, una pequeña porción de proteína y minerales como el potasio, magnesio y fósforo, además de moléculas con actividad antioxidante y fibra (FAO 2008). Esta riqueza en cualidades nutricionales ha hecho que este cultivo sea uno de los más importantes para la alimentación humana y para ganado, especialmente los tubérculos pequeños y dañados (Martínez, 2002). Los tubérculos también son aprovechados como materia prima, ya que

con el almidón se elabora papel, textiles, pegamentos, bebidas alcohólicas y otros alimentos procesados (SIOVM, 2010).

La siembra de papa, por lo general se lleva a cabo con "papas semillas", que son pequeños tubérculos (microtubérculos) o fragmentos de éstos, los cuales se introducen a una profundidad de 5 a 10 centímetros en la tierra. Las papas semilla son el insumo más costoso en la producción de papas, y representa del 30% al 50% de los costos de producción. El tubérculo semilla debe estar libre de enfermedades por lo que se ha generalizado su producción en cultivos *in vitro*, también debe tener buenos brotes y pesar de 30 a 40 g (FAO, 2008 [1]).

El cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica en la cual órganos o pequeñas secciones de tejido son disectados de una planta donadora y cultivados asépticamente en un medio nutritivo estéril químicamente definido con macro y micro elementos (sales orgánicas), fuente de carbono, vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y probablemente giberelinas (Arriaga *et al*, 2010).

Producción de microtubérculos *in vitro*

El cultivo *in vitro* de la papa permite obtener microtubérculos o papa semilla libre de virus y patógenos en un periodo relativamente corto para la producción de papa en campo, este método garantiza mayor eficiencia en la germinación y producción de papa, en comparación de la siembra con semilla real.

Los microtubérculos también son utilizados para la conservación de germoplasma en medios de cultivo que limitan el desarrollo rápido de éstos. El periodo máximo de conservación de microtubérculos frescos es de 15 meses (Gopal *et al*, 2005), hecho que reduce el costo, espacio y tiempo requerido para almacenar el germoplasma. El uso de microtubérculos se recomienda ya que éstos no se secan tan rápido como las plantas y son más resistentes a los trasplantes (Seabrook y Coleman, 1988).

Tuberización

La tuberización es la formación del tubérculo que es un órgano con doble función: de almacenamiento de nutrimentos y de sistema de propagación vegetativa. Los tubérculos se forman a partir de tallos subterráneos llamados estolones que se clasifican en primarios y secundarios de acuerdo a su origen. Generalmente, los entrenudos basales de los estolones primarios no desarrollan tubérculos en campo.

Los tubérculos inicialmente se reconocen como un engrosamiento en la punta del estolón (O'Brien *et al*, 1998). El engrosamiento del estolón ocurre cuando éste deja de alargarse y las células de la médula y el córtex crecen y se dividen transversalmente. Después, las células de la región perimedular crecen y se dividen en direcciones aleatorias para formar el volumen del tejido del tubérculo (Jackson, 1999).

Para que se forme un tubérculo debe haber un proceso de inducción y otro de iniciación de la tuberización.

Inducción

Esta fase ocurre antes del periodo de iniciación y puede ser definido como un cambio fisiológico que resulta en el característico engrosamiento del estolón (O' Brien *et al*, 1998). La asimilación del nitrógeno (N) libre del sustrato no se relaciona directamente con la inducción de la tuberización, sin embargo es capaz de inhibir el desarrollo del tubérculo, una vez que tuvo lugar la inducción. Krauss en 1985, planteó la hipótesis de que la concentración relativa de giberelinas (GA's) con respecto al ABA y el nivel alto de carbohidratos en relación a la concentración de N son las señales que promueven la tuberización (Jackson, 1999).

El aumento de la temperatura y del fotoperiodo son factores que inhiben la tuberización, se ha reportado que el aumento de la temperatura en el dosel de la planta da como resultado el aumento en el nivel de GA's en el meristemo, lo que afecta severamente la tuberización (Benavides, 2003).

Alta irradiación junto un fotoperiodo corto, tiene efecto positivo sobre la inducción de la tuberización, ya que se presenta una mayor asimilación de CO₂ por unidad de biomasa seca foliar, mayor acumulación de almidón foliar durante el día y transporte de fotosintatos de las hojas respecto al resto de la planta (Jackson, 1999). No obstante, hay un amplio rango en la sensibilidad al fotoperiodo entre los diferentes cultivares, particularmente en los que han sido seleccionados y adaptados a un ambiente específico (O' Brien *et al* 1998) por lo que la respuesta al fotoperiodo puede variar.

Iniciación

Se da un cambio en la orientación de la división celular en el estolón lo que produce expansión radial en lugar de crecimiento longitudinal. Si el estolón no experimenta tal cambio, entonces, se desarrollará un tallo que emergerá del sustrato. La base microestructural de la iniciación de la tuberización radica en el reacomodo de microtúbulos dentro de las células. Después de la terminación de la iniciación, algunos tubérculos pueden ser reabsorbidos (O' Brien *et al*, 1998).

En presencia de ABA los microtubérculos son pequeños en comparación a los desarrollados en medio de cultivo sin ABA (Gopal *et al*, 2004). El efecto contrario se observa al añadir citocininas en el medio, por ejemplo, la benciladenina (BA) es una hormona usada en el medio de microtuberización en el Centro Internacional de Papa, en Lima, Perú (Estrada *et al*, 1986).

Cuando se forma el tubérculo, hay un desvío abrupto preferencial de fotoasimilados al tubérculo, por lo que cesa el crecimiento de follaje y raíces (Ewing y Struik, 1992) así que una temprana iniciación de la tuberización resulta en una planta pequeña con área foliar limitada y por lo tanto, un bajo rendimiento final de tubérculos. En experimentos en cámaras de crecimiento se observó que el área foliar y su duración está determinada por la medida de la planta en el momento de la iniciación de la tuberización por lo que es la influencia dominante en el crecimiento subsecuente de la planta. (Bremner y Radley, 1966).

Entre los elementos que afectan el cultivo de papa, está la presencia de malezas. Estas plantas compiten con este cultivo por factores vitales: espacio, luz, agua, nutrientes, o actúan como vectores de diversas plagas y enfermedades, o bien, tienen efectos alelopáticos. Estos factores disminuyen la calidad y el rendimiento del cultivo. Particularmente los efectos alelopáticos sobre el crecimiento y desarrollo de la papa se han estudiado poco, por lo que es necesario hacer estudios *in vitro* para eliminar la competencia de los compuestos alelopáticos presentes en condiciones de campo y así poder observar los efectos de un alelopático en particular. La cumarina como uno de los

componentes alelopáticos más comunes con efecto particularmente reportado sobre tuberización, no ha sido estudiada desde el punto de vista del efecto metabólico que produce en esta planta.

Por esta razón, se plantea que la presencia de cumarina (1,2 benzopirona), afectará la formación de tubérculos y el crecimiento de papa (*S. tuberosum*) *in vitro*, particularmente induciendo alteraciones en la actividad fotosintética, ésta hipótesis condujo a proponer los siguientes objetivos.

Objetivos

General

- Evaluar el efecto de la cumarina (1-2 benzopirona), en el crecimiento de la papa (*Solanum tuberosum* L. variedad Tollocan) *in vitro*.

Particulares

- Propagar *in vitro* plantas de papa (*Solanum tuberosum* var. Tollocan).
- Aplicar cumarina en diferentes concentraciones y determinar su acumulación en vástago y raíz.
- Evaluar el efecto de la cumarina sobre el crecimiento y la tuberización.
- Evaluar los efectos de la cumarina sobre la fluorescencia de la clorofila a del PSII.
- Determinar la concentración y proporción de clorofila a y b.

Materiales y métodos

Material vegetal y tratamientos

Se propagaron plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. variedad Tollocan a partir de plantas *in vitro* conservadas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos, FES Iztacala, para lo que se sembraron secciones de tallo de 2 cm con uno o dos entrenudos (explantes). Se utilizó medio de cultivo MS62 (Murashige y Skoog, 1962) [Ver anexo] esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 lb de presión. La unidad experimental consistió de tubos de ensayo con 10 ml de medio y un explante. El cultivo se mantuvo a 23 ±1 °C bajo un fotoperiodo de 8 horas con lámparas de luz fría y cálida, a 100 μmol·m²·s⁻¹.

Al obtener las plantas propagadas, fracciones de 2 cm con al menos dos entrenudos se sembraron en medio MS62 adicionado con cumarina 1, 2 benzopirona disuelta en etanol a concentraciones finales de 0, 15, 25, 50 y 100 mg/l con 60 repeticiones de cada tratamiento.

Crecimiento

Se midió la relación raíz/vástago (*r/v*) con la intención de evaluar el crecimiento de la plántula. Se midió la longitud del vástago y de la raíz de cada plántula de los tratamientos, además se dio seguimiento al desarrollo de raíces secundarias.

Determinación de presencia de cumarina

Se determinó el contenido de cumarina por gramo de tejido fresco. Para ello, se realizaron extractos etanólicos de 100 mg de polvo seco de vástago o raíz sonicados (Bransor Soniffier 250) en 1 ml de etanol al 70% por 30 segundos y filtrados a través de una membrana de 45 μm. Los extractos fueron analizados mediante HPLC (HP Series 1100) de acuerdo al método propuesto por Yeon *et al* (2009). Se leyó a 274 nm con un flujo de 1.0 ml/min y un loop de 10 μl de muestra con una columna de 5 μm

Discovery C18 de Supelco a 23 °C. La fase móvil fue compuesta por 40:60 ACN:H₂O. La solución estándar fue preparada a 15 µg/ml cumarina/ etanol 70%.

Tuberización

Se evaluó el porcentaje de tuberización y los días en los que tardaron en desarrollarse los tubérculos, de los cuales se midió su peso, diámetro y longitud.

Fluorescencia de la clorofila a

Se midió la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II en cada tratamiento con 5 repeticiones a 7, 15, 21 y 30 días. La medición se realizó con un Plant Efficiency Analyser, PEA (Hansatech) con muestras preacondicionadas a la oscuridad por 10 minutos para asegurar que todos los centros de reacción se oxidaran completamente. Se aplicó un destello de luz roja con intensidad de 3000 µm²•s⁻¹ a partir de lo cual fueron calculadas la fluorescencia mínima (F₀), fluorescencia máxima (F_m), absorción por centro de reacción (ABS/RC), eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria (φ₀), eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón más allá de Q_A (ψ₀), el índice de funcionamiento (PI_{ABS}), la fluorescencia variable y la variable relativa con los programas Handy Pea, versión 1.30 2002 de Hansatech Instruments Limited y el programa Byolyzer 2002 de Bioenergetics Lab. versión 4.0.30.03.02.

Concentración de Clorofila a y b

Para la medición de la concentración de clorofilas se maceró 1 g del vástago de la planta por tratamiento en 5 ml de acetona al 80%, después se centrifugó a 5000 G por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 663 nm para la clorofila a y 645 nm para la clorofila b.

Se utilizaron las siguientes fórmulas para calcular la concentración de clorofilas:

- a) Concentración total de clorofila en mg/ml

$$[Chl Total] = (0.0202 A_{645}) + (0.00802 A_{663})$$

b) Concentración de clorofila a en mg/ml

$$[Chla] = (0.0127 A663) - (0.00269 A645)$$

c) Concentración de clorofila b en mg/ml

$$[Chlb] = (0.0229 A645) - (0.00468 A663)$$

En donde:

A645= Lectura de absorbancia a 645 nm.

A663= Lectura de absorbancia a 663 nm.

Resultados y discusión

Crecimiento

Las medias del índice raíz/vástago (r/v) en los diferentes tratamientos de concentración de cumarina (Figura 2) presentan diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) (Anexo II), es evidente que las raíces desarrolladas son más pequeñas en razón al aumento de cumarina y los días de incubación (Figura 2). Además se observaron raíces secundarias desde los 7 días de tratamiento (Figura 3A), mientras que en los tratamientos con cumarina, no hubo desarrollo de raíces secundarias. En el tratamiento de 100 mg/l se observó necrosis a partir del séptimo día de incubación (Figura 3E),

A los 7 días, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos de 25 y 50 mg/l, mientras que los tratamientos de 15 y 100 mg/l no desarrollaron raíces.

A los 15 días, los vástagos del grupo control crecieron más que las raíces. En las plantas del tratamiento con 15 mg/l (Figura 3B) el desarrollo de raíz comenzó desde los 10 días de incubación y dejaron de desarrollarse alrededor de los 18 días, nótese que en la medición (Figura 2) que las raíces de estas plántulas fueron más grandes que las del control pero sin ser significativamente diferentes del mismo modo que el tratamiento de 50 mg/l, mientras que las raíces de las plántulas incubadas en 25 mg/l crecieron más que en cualquier otro tratamiento. Las plántulas del tratamiento de 100 mg/l de cumarina murieron alrededor de los 14 días de incubación.

A 21 días el crecimiento de raíces fue similar en las concentraciones bajas de cumarina (15 y 25 mg/l) mientras que en la concentración de 50 mg/l de cumarina las raíces desarrolladas fueron muy cortas y el vástago tampoco presentó crecimiento perceptible (Figura 3D). Las plántulas sometidas a esta concentración murieron a los 25 días de incubación.

A los 30 días la longitud del vástago del grupo control fue mayor que el crecimiento de sus raíces, el efecto contrario se observó en el tratamiento de 15 mg/l de cumarina en el cual el índice permaneció sin cambios significativos con respecto a la medición de los 21 días de incubación.

La reducción en el crecimiento de la raíz es considerada como uno de los principales efectos asociados a aleloquímicos. Hussain, y colaboradores en el 2010, reportaron que el ácido p-hidroxybenzoico, compuesto fenólico al igual que la cumarina, redujo la longitud de raíces y vástago de lechuga.

Kupildlowska y colaboradores (1994) observaron que la cumarina afecta de forma diferencial la elongación de las raíces en pepino y maíz, las cuales incrementaron su diámetro cerca de la zona apical, como fue observado en el presente ensayo en el tratamiento de 50 mg/l.

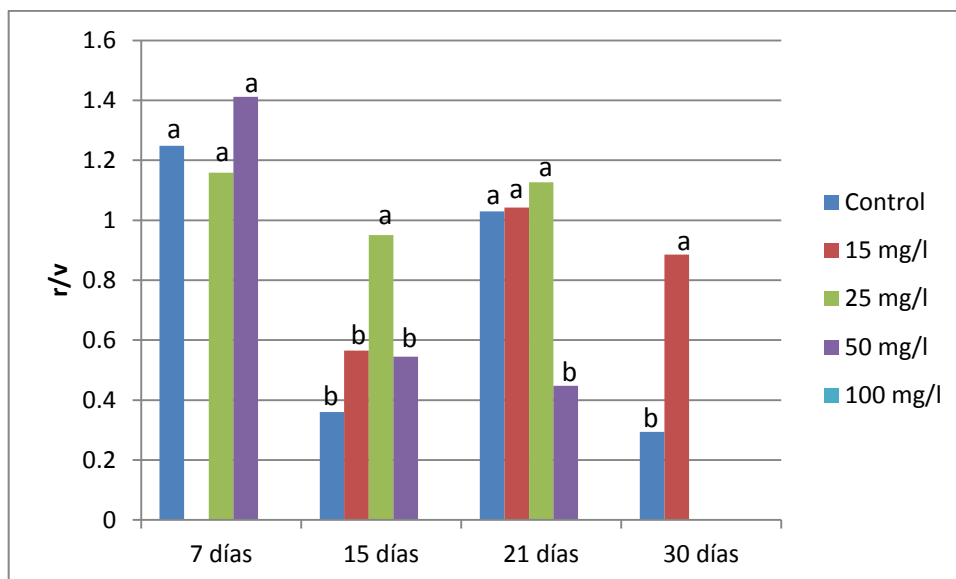


Figura 2. Medias de índice raíz/vástago de papa. Tratamientos en mg de cumarina por litro de medio de cultivo. Letras similares indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos $p \leq 0$.



Figura 3. Plántulas de papa en diferentes tratamientos. A) Tratamiento control a 7 días. B) Tratamiento de 15 mg/l a 15 días. C) Tratamiento de 25 mg/l a 15 días. D) Tratamiento de 50 mg/l a 21 días. E) Tratamiento de 100 mg/l a 7 días. Barra= 1cm.

Se ha reportado la reducción de la elongación de vástago y raíces en calabaza a concentraciones de $50 \mu\text{M}$ ($73\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) de cumarina (Hossain *et al*, 2008). Los resultados del presente trabajo muestran que a concentraciones por arriba de los 25 mg/l ($\approx 17\mu\text{M}$) se reduce evidente en la elongación de raíces.

Se ha estudiado el mismo efecto en *Avena* y *Plenum pratense* (Goodwin y Avers, 1950; Avers y Goodwin, 1956) donde se indica que la inhibición es causada por la reducción del metabolismo y del

bloqueo de la mitosis en el tejido de la raíz. Aún no se ha definido el proceso que explique tal respuesta.

Determinación de la presencia de cumarina en plántulas.

En la cromatografía líquida de alta presión, la cumarina fue detectada a los 6 minutos. Se hizo una sola medición por tratamiento. A los 7 días, se observó un aumento de la concentración de cumarina por gramo de tejido fresco correspondiente a la concentración en el medio de incubación. La determinación se pudo hacer sólo en los vástagos incubados en 25, 50 y 100 mg/l de cumarina, debido a que no se detectó cumarina en las raíces ni en el tratamiento de 15 mg/l (Figura 4).

A los 15 días de incubación se observa que la cumarina parece traslocarse al vástago y almacenarse ahí. Las plántulas del tratamiento de 100 mg/l no desarrollaron raíces, por lo que sólo se midió en el vástago. A 21 días se observó la misma tendencia, se encontró que la concentración más alta en el vástago corresponde al tratamiento de 100 mg/l.

En la figura 4 es evidente que la mayor concentración de cumarina se encuentra en el vástago, por lo que podemos proponer que de acuerdo a la concentración y tiempo de incubación, la cumarina se traslada al vástago de las plántulas. Neuman (1960) reportó que el 85 al 90% de la cumarina que la planta toma del medio, puede ser recuperado del tejido. En su investigación, encontró que segmentos del hipocotilo de *Helianthus annuus* incubados en una solución de cumarina a 1.3 mM (≈ 189.9 mg/l)

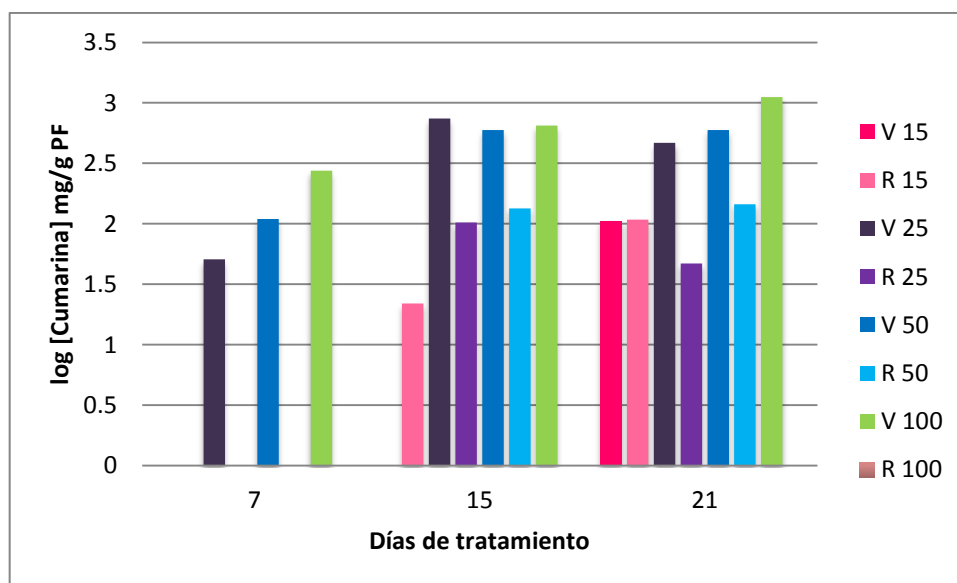


Figura 4. Concentración de cumarina por gramo de tejido fresco (V= vástago, R= raíz) medida en HPLC.

alcanzan un equilibrio en contenido de cumarina en el tejido y en la solución de incubación a los 10 días, al inicio del tratamiento observaron una alta tasa de absorción que luego se redujo y se mantuvo sin cambios después de 10 días. Sus resultados concuerdan con Bagni y Fracassini (1971), quienes concluyen que probablemente no haya transformación de la molécula de cumarina en el tejido.

Nuestros resultados muestran que la cumarina se traslocó al vástago sin catabolizarse o sufrir transformaciones y que puede ser absorbida por las raíces o el tallo, ya que la acumulación también se observó en plantas que no habían desarrollado raíces.

Porcentaje de tuberización

Las plántulas del grupo control comenzaron a tuberizar alrededor de los 10 días de cultivo, este grupo alcanzó el 40% de tuberización a los 30 días y el 100% en 45 días (Figura 5). En el tratamiento de 15 mg/l de cumarina se observó un desarrollo acelerado de tubérculos a los 21 días con respecto al control, estos tubérculos fueron más grandes en longitud, diámetro y peso (Figura 6), sin embargo el porcentaje de tuberización máximo fue de 20% y los tubérculos de este tratamiento que fueron medidos a los 30 días registraron medidas menores. Sin embargo, las plántulas de este tratamiento sobrevivieron hasta los 37 días.

Las plántulas del tratamiento de cumarina 25 mg/l desarrollaron los tubérculos más pequeños (Figura 5), solo alcanzaron 10% de tuberización y las plántulas sobrevivieron hasta 25 días. En los tratamientos de concentraciones altas de cumarina (50 y 100 mg/l) no se observó algún tubérculo diferenciado con la característica forma esférica, ni engrosamiento en el estolón que indicara el inicio de la formación del tubérculo.

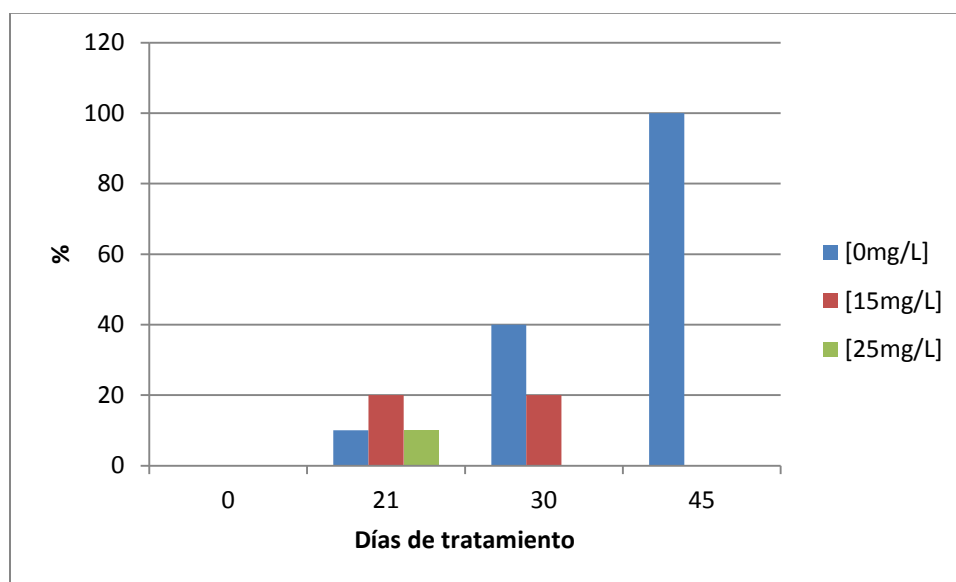


Figura 5. Porcentajes de tuberización registrados en los diferentes días de medición.

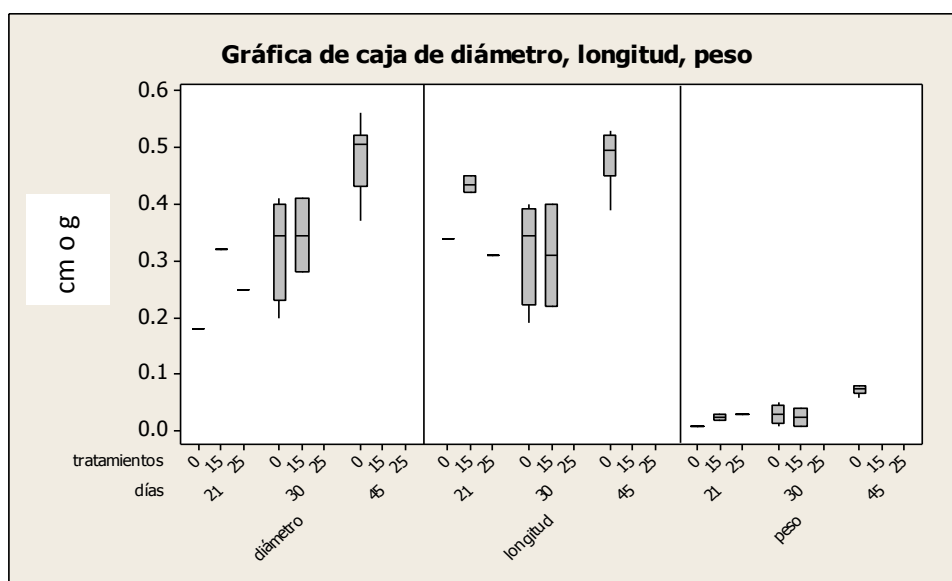


Figura 6. Gráfica de caja donde se muestran los valores obtenidos en diámetro, longitud y peso en los diferentes días de medición (21, 30 y 45 días) por cada tratamiento (concentración de cumarina en el medio, 0, 15, 25 mg·l⁻¹). Las líneas horizontales representan las medias de los tratamientos. La longitud del rectángulo muestra la distribución de los datos.

Las condiciones de incubación fueron las óptimas para la tuberización, los tratamientos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 8 h luz, a una temperatura de 16-25 °C. Estas condiciones han sido reportadas como favorables para el desarrollo de microtubérculos. (Ghavidel *et al*, 2012). La concentración de sacarosa usada en el medio está dentro del intervalo que no tiene efecto adverso en la tuberización según El-Sawy *et al*, en el 2007, y no limita el crecimiento de raíz (Stallknecht y Farnsworth, 1982). Niveles por arriba del 40% de sacarosa proveen una buena fuente de carbono fácilmente asimilable para el crecimiento del microtubérculo (Aslam e Iqbal, 2010).

Los resultados de tuberización obtenidos difieren a los reportados por Stallknecht y Farnsworth (1982) donde las plantas incubadas en medios con concentraciones de 25 a 50 mg/l y 60% de sacarosa tuberizan a los 10 días. El-Sawy y colaboradores (2007) indican que la frecuencia más alta de microtubérculos se encontró en el medio con 9% de sacarosa y 40 mg/l de cumarina. Similarmente, Prange y colaboradores (1990) reportaron que 25 mg/l de cumarina y 60 g/l de sacarosa son óptimos para la tuberización. En nuestro estudio, con la misma concentración de sacarosa (60 g/l), las plantas con 25 mg/l de cumarina, alcanzaron un 110% a los 21 días, y murieron a los 25 días, concentraciones más altas resultaron tóxicas para las plantas.

Se observó una disminución en la longitud y diámetro de los tubérculos desarrollados en presencia de cumarina por lo que se sugiere que hay un proceso de reabsorción del tubérculo posiblemente porque éste se convierte en la única fuente de carbono disponible para la plántula.

Estos resultados discordantes pueden ser debidos a que la capacidad de tuberización *in vitro*, depende del genotipo (Liljana *et al*, 2012). No obstante, se han observado en gran número de investigaciones que la cantidad de sacarosa es el factor mayormente determinante en la formación

del tubérculo (Tugrul *et al*, 2001). Además, en estudios previos no se ha aplicado únicamente la cumarina, Svensson (1972) reportó que la interacción de la cumarina y otros reguladores de crecimiento puede incrementar o decrementar el contenido endógeno de esos reguladores, modificar la acción de ellos o favorecer la formación de metabolitos en la síntesis o descomposición del regulador en cuestión por los efectos de la cumarina.

Ortiz y Lozoya (1987) reportaron la tuberización de dos cultivares de papa, Atzimba y Juanita, en diferentes medios de cultivo, sus resultados arrojaron que el medio con 25 mg/l de cumarina induce respuestas variables en cada cultivar, Atzimba alcanzó el 100% de tuberización en un fotoperiodo de 8 horas, mientras que el cultivar Juanita, solo el 20 al 60% de las plántulas tuberizaron. El uso de retardantes de crecimiento (como la cumarina), regularmente suprimen la actividad de giberelinas (GA's), y no siempre estimulan la inducción. Los retardadores de crecimiento pueden estimular la tuberización solo bajo condiciones débiles de inducción por ejemplo, baja concentración de sacarosa (Donnelly *et al*, 2003). El desarrollo de tubérculos en presencia de cumarina puede ser una respuesta al estrés.

Con base a lo anterior podemos suponer un efecto antagónico entre la cumarina y GA's debido a la ausencia de desarrollo de estolones. Las GA's aumentan la elongación y crecimiento del estolón (Aksenova *et al* 2012) sin embargo esta condición es desfavorable para el desarrollo del tubérculo, la ausencia de GA's en el medio de cultivo resulta en la división celular longitudinal del estolón, hecho relacionado con la formación del tubérculo. Además, plantas tratados con GA reducen el contenido de almidón en tubérculos y suprimen la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de almidón (Obata y Suzuki *et al*, 1979). El efecto contrario se observa con la adición de citocininas, las cuales estimulan la formación de tubérculos (Ewing, 1995 citado por Aksenova, 2012) por lo que la adición al medio de cultivo de estas sustancias repercutirá en la tuberización. La kinetina, una citocinina, estimula la tuberización temprana, Ortiz y Lozoya (1987) mencionan que esta respuesta no está relacionada con un alto rendimiento o el 100% de tuberización. Stallknecht (1972) reportó a la cumarina como un inductor de tuberización, sin embargo, en el medio de cultivo adicionó kinetina, siendo este el verdadero factor inductor de tuberización. Las citocininas estimulan la división celular junto a las auxinas, y estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical, por lo que, al eliminar el meristemo apical en los explantes cultivados, la adición de citocininas puede resultar innecesaria (Donnelly *et al*, 2003).

Análisis de fluorescencia

Se caracterizó la actividad fotoquímica del fotosistema II por medio de la emisión polifásica de la fluorescencia en muestras expuestas a diferentes concentraciones de cumarina durante un periodo de 15, 21 y 30 días. Cabe destacar que únicamente a los 15 días se pudo obtener la medición de todos los tratamientos debido a que las plántulas de los tratamientos 50 y 100 mg/l no sobrevivieron a la medición de los 21 días, ni el tratamiento de 25 mg/l de cumarina a los 30 días, por lo que los datos

que se presentan solamente corresponden al efecto del compuesto a los 15 días de tratamiento.

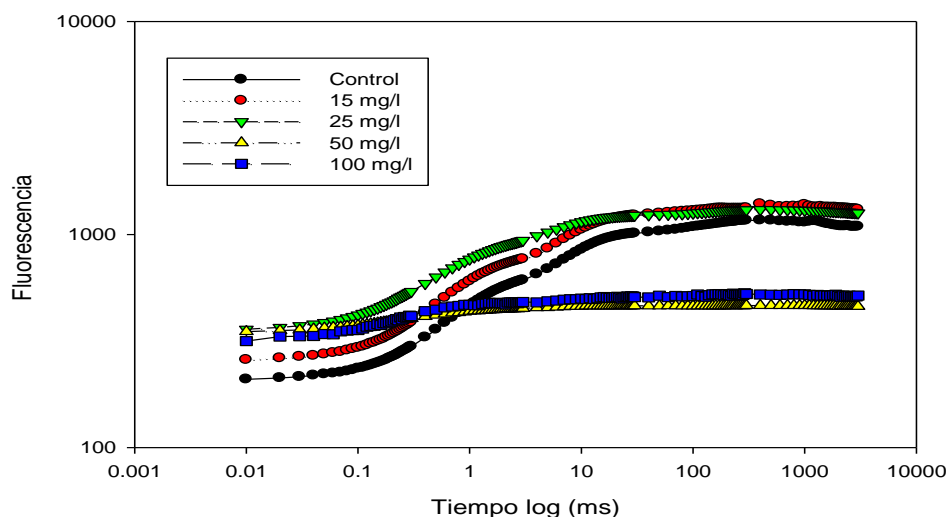


Figura 7. Efecto de la cumarina en la emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II a 15 días de incubación.

La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II nos permite caracterizar el acarreo de electrones a través del fotosistema II y la eficiencia con la que se absorbe la energía. La cinética polifásica consta de varias inflexiones que las cuales se corresponden con la actividad fotoquímica. La inflexión O, denota al origen o la fluorescencia mínima (F_0) cuando se registra ésta señal, el primer acarreador está completamente oxidado (Maxwell y Johnson, 2000). Se establece que el primer acarreador es la quinona A, (Q_A) y todo los centros de reacción también están oxidados o completamente abiertos, no hay certeza en que si el estado de los centros de reacción (abiertos o cerrados) sea debido al estado redox de la quinona a o al de la feofitina (Strasser *et al*, 2004) F_0 se observa alrededor de los 20 a 50 μ s en condiciones fisiológicas normales. La siguiente inflexión en la curva corresponde a la fase J, que denota a la reducción parcial de Q_A se observa a los 2 ms. Después está la fase I, a los 20 ms, y refleja la reducción parcial de Q_A y de la quinona b (Q_B). La última fase es la P o de fluorescencia máxima (F_m) en este punto, todos los centros de reacción están reducidos y los acarreadores Q_A y Q_B están reducidos. Se pueden apreciar diferencias en la cinética de fluorescencia más evidentes de acuerdo al aumento de concentración de cumarina en el medio.

Como se puede observar en la figura 1, existen diferencias en la cinética de fluorescencia conforme aumentó la concentración de cumarina en el medio de cultivo. Las mediciones obtenidas a los 15 días muestran que a concentraciones de 15 mg/l de cumarina la F_0 (Figura 1) aumentó sólo un 22.9% siendo este el tratamiento con menor efecto sobre este parámetro, en concentraciones de 25 y 50 mg/l aumentó el 72% y 71.7% respectivamente a comparación del control, mientras que la concentración más alta, 100 mg/l aumentó en un 57%.

El aumento de la fluorescencia mínima (F_0) indica un posible daño en el funcionamiento de la antena de fotosistema II (LHC-PSII) debido a que no toda la energía absorbida se trasmite al centro de reacción por lo que es disipada como fluorescencia. Éste resultado indica que la exposición a cumarina, disminuye la capacidad de transferencia de energía de la antena al centro de reacción, sin embargo en la concentración más elevada (100 mg/l), el valor de F_0 es inferior, lo que podría estar relacionado no solamente a una disminución de la transferencia de la energía absorbida, sino a un “apagamiento” o un daño de la estructura de la antena, lo cual disminuye la emisión de fluorescencia, posiblemente debido a una disminución de la concentración de clorofila a.

La figura 1 también muestra el aumento en la fase J del tratamiento de 15 y 25 mg/l de cumarina con respecto al control, este aumento refleja la acumulación de Q_A^- en donde puede o no existir flujo de electrones más allá de este aceptor reducido (Valdés, 2005) sin embargo, los valores de la emisión de fluorescencia son casi similares a los del valor de F_0 , lo que indica el bloqueo del transporte de electrones hacia el lado aceptor del sistema (Q_A), posiblemente por una inhibición en el aporte de electrones por parte del complejo liberador de oxígeno (González *et al*, 2008).

El aumento que se observa en la fase J y la fase I, del tratamiento de 15 y 25 mg/l responde al aumento en la velocidad de reducción de Q_A debido a un bloqueo del paso de electrones entre Q_A y Q_B .

El análisis de la curva OJIP debe complementarse con el análisis de los parámetros de: eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria (ϕ_{P_0}), el parámetro de eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón más allá de Q_A^- (ψ_0) y con el parámetro de probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- (ϕ_{E_0}) y es determinado por la diferencia de los parámetros anteriores. En conjunto se les conoce a éstos como los rendimientos cuánticos operacionales y su medición sirve para definir la fase en la que el flujo de electrones es mayormente afectado por la presencia de cumarina en este caso.

ϕ_{P_0} está dado por:

$$\phi_{P_0} = \frac{TR_0}{ABS}$$

Donde TR_0 es el flujo de energía transferida al centro de reacción que será convertida en energía redox reduciendo Q_A a Q_A^- , y ABS es el flujo de electrones absorbidos por los pigmentos antena. Este parámetro también es conocido como fase lumínica ya que su valor puede ser modificado por la intensidad lumínica (González *et al*, 2008).

ψ_0 está dado por:

$$\psi_0 = \frac{ET_0}{TR_0}$$

Donde ETo es el flujo de transporte electrónico, este parámetro también es conocido como fase térmica ya que sus valores se modifican con la temperatura, no así con la intensidad lumínica.

En la figura 8 se observan los valores de los rendimientos cuánticos operacionales. El tratamiento de 15 mg/l de cumarina mostró la menor reducción con respecto al grupo control, ϕ_{Eo} sólo disminuyó 8.12%, explicado por la disminución de ψ_o que fue del 6.85% a comparación de la disminución de ϕ_{Po} que fue solo del 1.36%, el mismo comportamiento se observó en el tratamiento de 25 mg/l donde la disminución de ϕ_{Eo} fue del 36.96%, debido principalmente a la disminución del 27.52% de ψ_o contra un pequeño 13.01% del ϕ_{Po} , a 50 mg/l, la probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- se reduce en 92.46% debido a la disminución del 73.4% de la eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria y de un 71.66% de el parámetro de eficiencia con la que un electrón puede mover un electrón más allá de Q_A^- . A 50 mg/l, la probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- se reduce en 92.46% debido a la disminución del 73.4% de la eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria y de un 71.66% del parámetro de eficiencia con la que un electrón puede mover un electrón más allá de Q_A^- . En la concentración más alta (100 mg/l de cumarina) disminuyó ϕ_{Eo} en un 81.87% debido a la disminución del 58.08 y 56.73% de ψ_o y ϕ_{Po} respectivamente.

Estos resultados reflejan que la concentración más baja de cumarina no tiene efecto sobre ϕ_{Eo} , mientras que las concentraciones de 25, 50 y 100 mg/l el efecto es principalmente sobre el lado aceptor del fotosistema (ψ_o).

En condiciones óptimas, el valor de ϕ_{Po} es de 0.8 y decrece en situaciones de estrés (Krause y Weiss, 1991). Si tal valor se encuentra por arriba del 0.8 puede significar que la planta es capaz de adaptarse a la condición de estrés (Mani *et al*, 2012). Un decremento sustancial en este valor indica daño en RC-PSII (Colom y Vazzana, 2003; Maxwell y Johnson 2000).

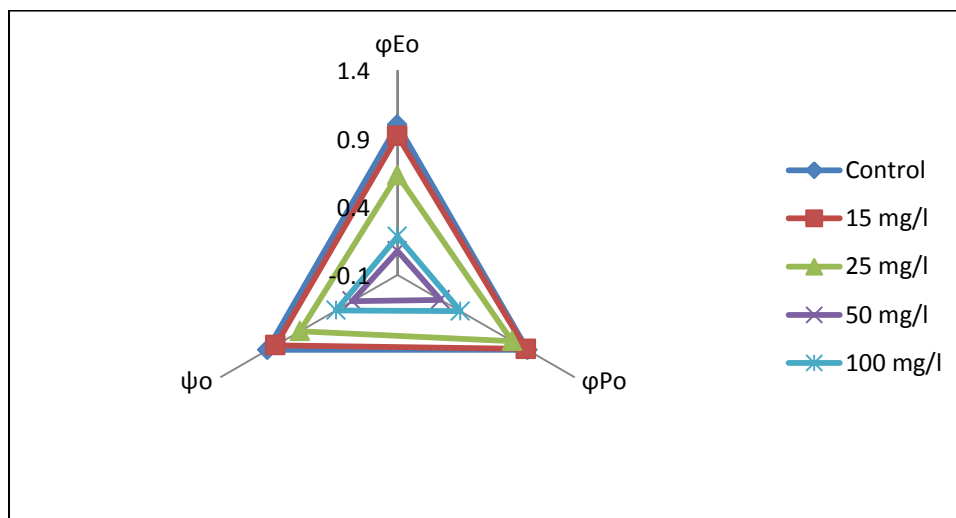


Figura 8. Rendimientos cuánticos operacionales a 15 días de incubación a diferentes concentraciones de cumarina. Eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria (ϕ_{Po}). Eficiencia con la que un electrón puede mover un electrón más allá de Q_A^- (ψ_o). Probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- (ϕ_{Eo}).

Se ha estudiado el efecto del ácido felúrico, en plántulas de lechuga, donde se ha observado que reduce la eficiencia cuántica máxima al igual que del ácido p-hidroxibenzoico (Hussain, 2010). A pesar que los agentes alelopáticos actúan de manera diferente en el metabolismo de las plantas, la cumarina tiene el mismo efecto que los dos compuestos fenólicos anteriores, por lo que puede pensarse que las repuestas son similares entre la naturaleza química de los metabolitos secundarios.

Zhou y You (2006) reportaron que los aleloquímicos pueden afectar significativamente el rendimiento de tres procesos principales de la fotosíntesis, estos son: el control estomático del abastecimiento de CO₂, el transporte electrónico en tilacoides y el ciclo de reducción del carbono. A tal lista debe agregarse el daño a los RC-PSII.

Cuando los valores de fluorescencia son graficados como fluorescencia relativa en el tiempo permiten visualizar de manera dinámica la reducción de Q_A hasta Q_A^- (González *et al*, 2008). La fluorescencia relativa se obtiene con la siguiente fórmula:

$$Vt = \frac{Ft - Fo}{Fm - Fo}$$

En la siguiente figura (9) se puede observar que la velocidad inicial de la fluorescencia (M_0) que es el atrapamiento de electrones a tiempo 0 por centro de reacción, se incrementa de acuerdo a la concentración de cumarina usada reflejando un flujo de electrones bajo o un bloqueo parcial paso de electrones entre Q_A y Q_B . El incremento en la M_0 también responde al aumento de reducción de los centros de reacción (RC) o bien a que los RC no puedan llevar a cabo la separación de cargas (González *et al*, 2008). De igual forma se observa que la dinámica de Q_A aumenta en la fase J a I de acuerdo a la concentración de cumarina, lo que refleja que el paso de electrones está siendo bloqueado.

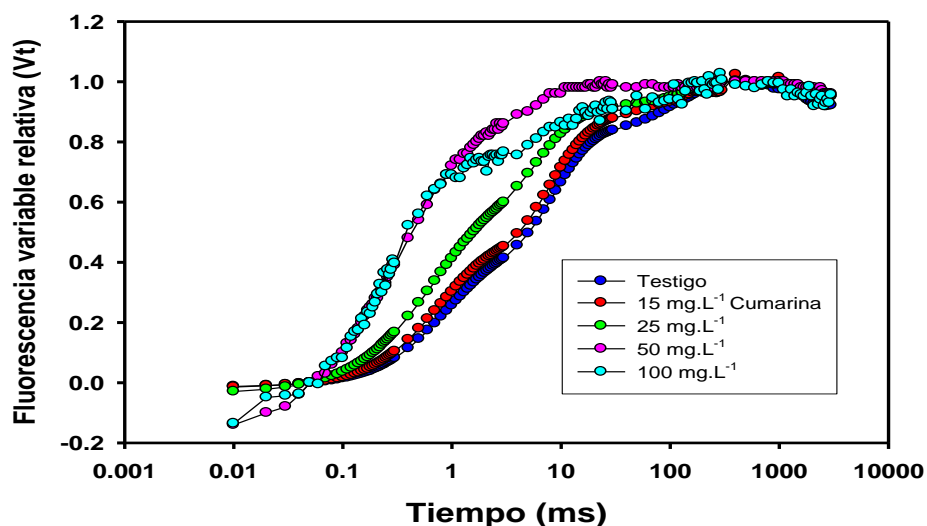


Figura 9. Fluorescencia variable de *Solanum tuberosum* var. Tollocan.

La gráfica construida con las diferencias valores de la fluorescencia experimental y testigo, permite comparar a los efectos de los tratamientos en la cinética de fluorescencia (Figura 10). Es muy claro que el efecto de la cumarina se agudiza al aumentar la concentración de esta en el medio.

A 15 y 25 mg/l se observa el aumento de la fluorescencia principalmente en la fase J e I demostrando que se afecta de forma negativa (inhibición) del transporte entre Q_A y Q_B .

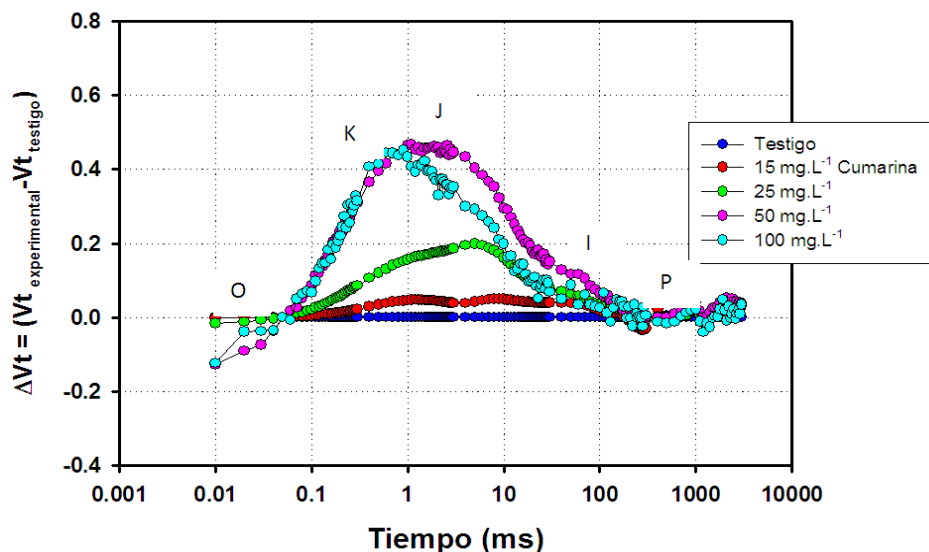


Figura 10. Fluorescencia variable relativa calculada de las diferentes concentraciones de cumarina. Se señalan las diferentes fases de la cinética de fluorescencia.

Se observa (Figura 10) la aparición de la fase K a partir del tratamiento de 25 mg/l haciéndose más evidente en los tratamientos de altas concentraciones (50 y 100 mg/l de cumarina). Esta fase se relaciona con la inhibición del complejo liberador de oxígeno. En esta misma figura se observa que la reoxidación de Q_A^- continúa transfiriendo electrones a Q_B , pero debido a la carencia de electrones procedentes del complejo liberador de oxígeno, la intensidad de la fluorescencia decrece (Strasser *et al*, 2004). Nótese el aumento evidente de la fluorescencia inicial (al graficarse diferencias, las inflexiones positivas reflejan inhibiciones y las inflexiones negativas reflejan aumentos).

El índice de funcionamiento (PI) es el parámetro más sensible debido a que combina criterios estructurales (el centro de reacción) y criterios funcionales (absorción, rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria y en la eficiencia con la que un electrón en la cadena transportadora de electrones más allá de Q_A^- a diferencia del índice φ_{P_0} el cual utiliza solo los valores extremos de la fluorescencia de la clorofila.

$$PI_{ABS} = \left[\frac{RC}{ABS} \right] \left[\frac{\varphi_{P_0}}{1 - \varphi_{P_0}} \right] \left[\frac{\psi_0}{1 - \psi_0} \right]$$

Este índice disminuyó de acuerdo a la concentración y tiempo de incubación. (Tabla 1). Plantas con incremento en este índice manifiestan una mayor tasa de transporte de electrones y disipan menos energía en forma de calor (Ripley, *et al*, 2004) mientras que una capacidad reducida del transporte de electrones puede ser debido a la inactivación de muchos centros de reacción, exceso de energía luminosa, un bajo rendimiento cuántico del PSII o un bajo transporte de electrones después de Q_A^- (Gonçalves *et al*, 2007), en este caso, observamos que el índice de PI disminuyó debido principalmente a una tasa baja de transporte de electrones más allá de Q_A .

Tratamiento	PIABS
Control	67.22 ±15.37
15 mg/l	45.35±19.27
25 mg/l	11.57±5.27
50 mg/l	0.06±1.05
100 mg/l	0.31±0.41

Cuadro 1. Valores del índice de funcionamiento del PSII a 15 días de medición en las diferentes concentraciones de cumarina.

El índice ABS/RC indica la absorción del flujo fotónico por centro de reacción. Se refiere a la energía absorbida por las moléculas de clorofila en la antena del PSII en relación a la cantidad de centros activos (Strasser *et al*, 2000), es influenciado por la proporción de centros de reacción activos/inactivos.

Se observa (Figura 11) que el índice aumentó de acuerdo a la concentración de cumarina, las concentraciones bajas, 15 y 25 mg/l, aumentaron 15 y 59.14% respectivamente, estos incrementos fueron relativamente pequeños comparados con los registrados en las concentraciones altas de cumarina, así, el efecto más alto se observó en la concentración de 50 mg/l que fue del 698.77% y en 100 mg/l de cumarina el aumento fue de 458.38% más que el control.

En incremento en este índice es causado por la reducción de centros de reacción activos. Castro *et al*, 2011, observó en hojas de papaya que el incremento de ABS/RC se relaciona con la degradación de clorofilas en papaya. Además, el índice ABS/RC demuestra la medida de la antena del PSII (Krüger *et al*, 1997) esto es la cantidad de clorofila absorbente por centro de reacción completamente activos (Strasser *et al*, 2004). Torres *et al*, 2001, citado por Castro *et al* 2011, reportaron que el aumento del índice responde al incremento de la medida de la antena relacionado a la reducción de la concentración de clorofila en hojas. Sin embargo, un aumento de ABS/RC con una disminución de

ϕ_{Po} , como lo encontrado en la presente investigación, indica que la antena no está aumentando, sino que los centros de reacción se inactivan, convirtiéndose en disipadores de calor, por este motivo, la energía absorbida por los centros de reacción activos aumenta, aun cuando su eficiencia cuántica para la fotoquímica primaria disminuye conforme aumenta la concentración de cumarina en el medio de cultivo. Por otro lado, Strasser *et al*, 2000 reportan que el índice RC/CS_o mide la cantidad de centros de reacción activos o funcionales del fotosistema II, lo cual confirma el resultado antes mencionado.

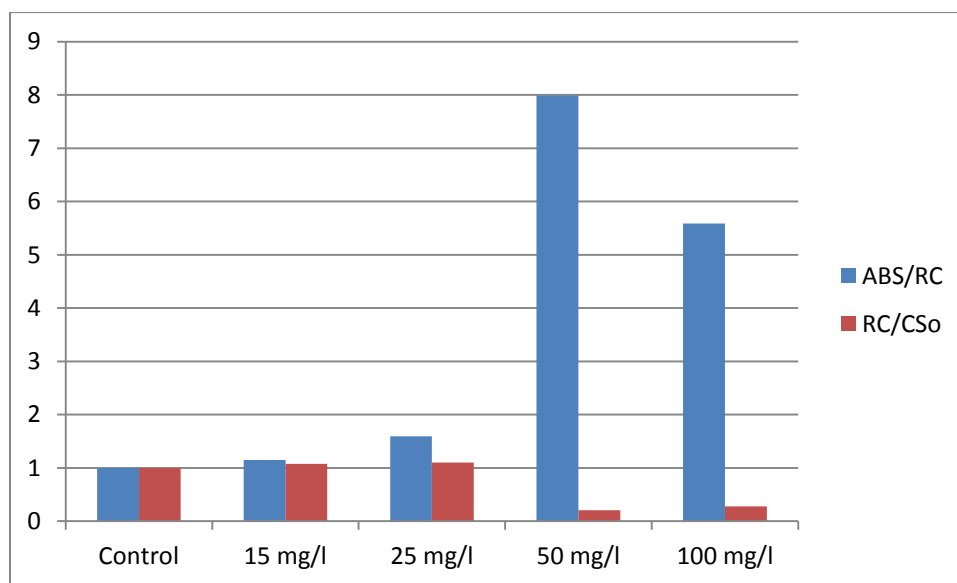


Figura 11. Índices de absorción por centros de reacción (ABS/RC) y de centros de reacción activos por área de emisión (RC/CS_o) de las plantas de papa *in vitro* a 15 días de ser incubadas a diferentes concentraciones de cumarina.

Concentración y proporción de clorofila a y b.

La concentración de mg de clorofila a por gramo fresco de tejido (Figura 12) mostró diferencias significativas ($p > 0.0018$) en relación a la presencia de cumarina en el medio (ver anexo III).

A los 7 días, la medición solo fue posible determinar en las plántulas del grupo control y de los tratamientos con 15 y 25 mg/l de cumarina. Estos tratamientos tuvieron diferencias significativas en una disminución en relación al control del 16.05 y 18.75% respectivamente.

A los 15 días se puede observar el efecto de todas las concentraciones usadas en este trabajo, donde se observó que la disminución de clorofila a fue de 83% para la concentración de 15mg/l de cumarina, 77.3% en 25 mg/l de cumarina, 73.5% en 50 mg/l y 95% en 100 mg/l de cumarina. Este resultado confirma el aumento registrado de F_0 en el análisis de fluorescencia, debido a que los cambios de clorofila están relacionados con cambios en los complejos antena (Perales, 2001). Además, se ha reportado que la reducción del contenido de clorofila está asociado a una disminución de asimilación fotosintética (Bettaieb *et al*, 2008) en hojas de gladiola y en hojas de papa (Mehovachi, 2004).

A los 21 días la disminución de clorofila fue proporcional al aumento de cumarina en el medio, se registró la disminución de un 75.4, 84.7 y 88.2% en 15, 25 y 50 mg/l de cumarina respectivamente. No fue posible medir la concentración de clorofilas de las plántulas incubadas en 100 mg/l de cumarina debido a que murieron antes de la fecha de medición.

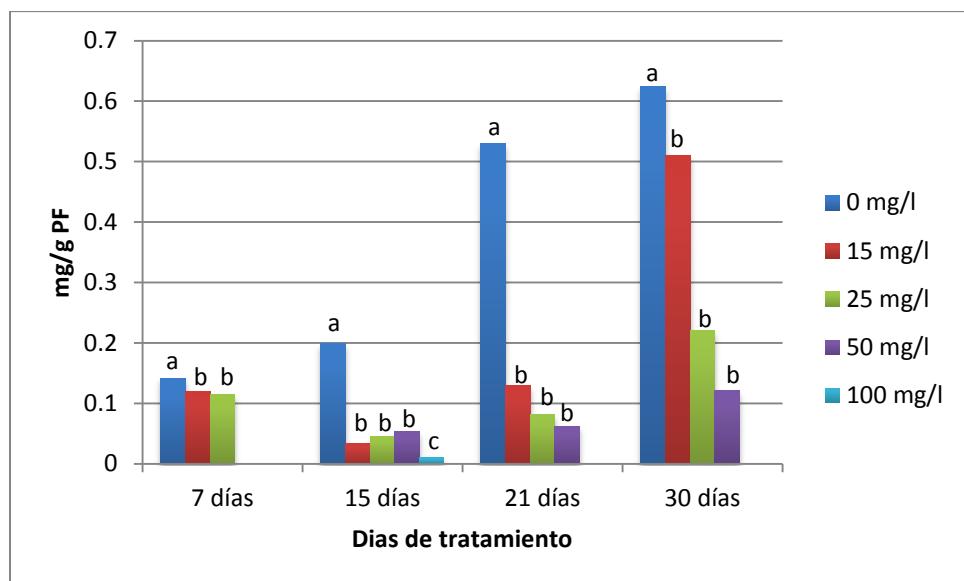


Figura 12. Concentración de miligramos de clorofila a por gramo de peso fresco del vástago. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$ $n=5$

Al analizar la concentración de clorofila b se encontró un comportamiento similar, con tendencia a disminuir (Figura 13). De igual forma los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p>0.003$). Por lo que se enfocó el análisis a los 15 días de medición.

Se observa que el tratamiento de 15 mg/l a los 15 días de incubación tuvo una disminución de clorofila b del 84.8%, en la concentración de 25 mg/l la disminución de clorofila b fue de 83.5%, mientras que a 50 y 100 mg/l de cumarina fue de 75.5% y 93.2% que resultaron ser las disminuciones más diferentes con respecto al control.

La cinética de síntesis de la clorofila mostró un comportamiento similar al descrito por Hernández y colaboradores (2003), donde se indicó que hay posible perturbación en la membrana del tilacoide a nivel de LHCII por la disminución del atrapamiento del flujo de la antena al RC, este efecto también se ve reflejado en el modelo de la hoja generado por el análisis de la fluorescencia.

Por otro lado, la relación de clorofila a/b (Figura 14) mostró diferencias significativas ($p>0.01$) en debido a los tratamientos. Se pueden observar dos efectos, los causados por las concentraciones “bajas” de cumarina (15 y 25 mg/l) que no provocan disminuciones significativas con respecto al control en el índice de clorofila a/b. Lo anterior refleja un posible proceso de feofitización.

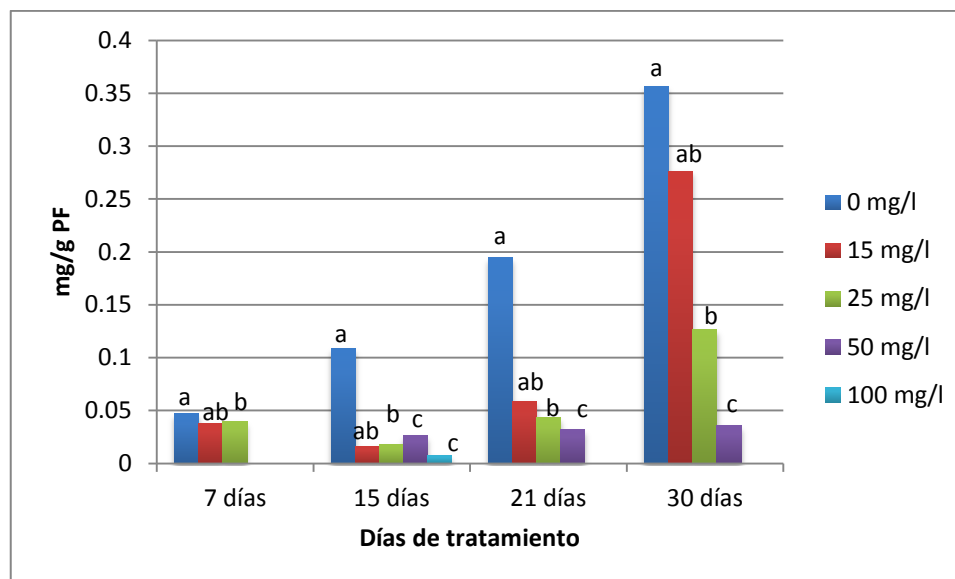


Figura 13. Concentración de miligramos de clorofila b por gramo de peso fresco del vástago. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$ $n=5$.

Se observa (Figura 14) que los tratamientos de 50 y 100 mg/l provocaron las diferencias más acusadas. De acuerdo con Anderson (1986), el incremento en la relación Chla/Chlb es inversamente proporcional al grado de apilamiento del cloroplasto y el grado de apilamiento es inversamente proporcional a la relación fotosistema I/II. En este experimento, observamos la disminución de la relación a/b, por lo que aumenta el grado de apilamiento y por lo tanto disminuye la relación de fotosistemas I/II presentes (Perales, 2001). Se asocia el PSII a zonas apiladas y el PSI, citocromo b/f y el complejo ATPasa a zonas no apiladas. Sin embargo, los cambios de proporciones no necesariamente significan una disminución en la eficiencia fotoquímica de PSII (Anderson, 1986).

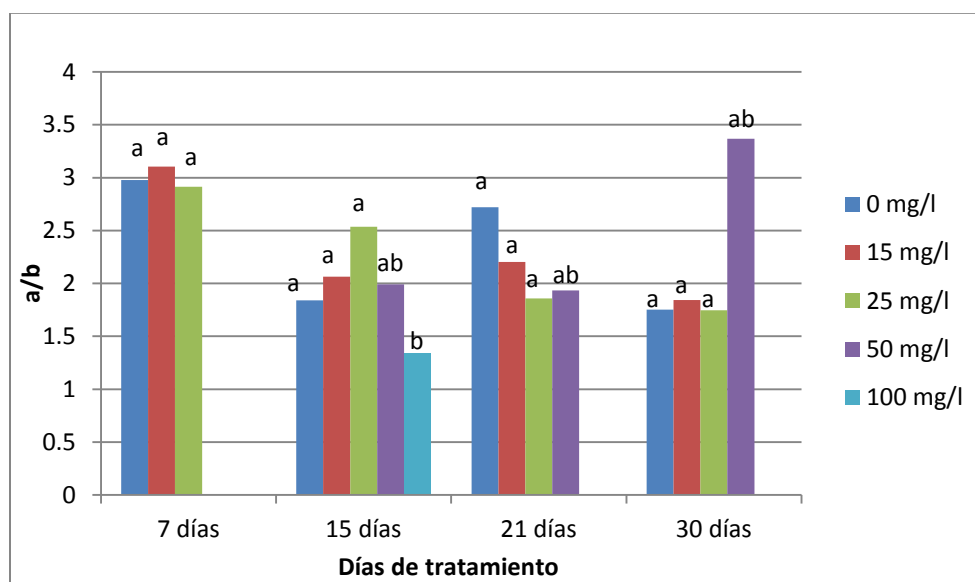


Figura 14. Proporción de clorofila a y clorofila b por gramo de peso fresco del vástago. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$ $n=5$.

Conclusiones

- El crecimiento de raíces disminuyó de forma proporcional a la concentración de cumarina 1,2 benzopirona en el medio y al tiempo de exposición. Se observó un retraso en la formación de raíces en concentraciones bajas de cumarina (15 y 25 mg/l).
- La cumarina se traslocó al vástago sin ser transformada aparentemente y se acumuló preferentemente en éste.
- La cumarina presente en el medio no indujo por si sola la tuberización de papa *Solanum tuberosum* L. var. Tollocan *in vitro*.
- La presencia de cumarina disminuyó la cantidad de clorofilas en la antena del fotosistema II, disminuyó la capacidad de transferencia de energía de la antena al centro de reacción y fue capaz de inactivarlos.
- A concentraciones bajas (15 y 25 mg/l) se disminuyó el paso de electrones de Quinona A a Quinona B, mientras que a concentraciones altas (50 y 100 mg/l) el daño fue principalmente en el complejo liberador de oxígeno.
- La síntesis de clorofila a y b disminuyó de acuerdo al aumento de la concentración de cumarina en el medio. Sin embargo, la relación a/b se mantuvo constante en concentraciones bajas.

Bibliografía

Abenavoli, M. R. Cacco, G. Sorgonà, A. Marabottini, R. Paolacci, A. R. Ciaffi, M. Badiani, M. 2006. The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* spp. *durum*, cv. Simeto) seeds. *Journal of Chemical Ecology*.32 (2): 489-506.

Abenavoli, M. R. Sorgona, A. Sidari, M. Badiani, M. Fuggi, A. 2003. Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) cells in suspension culture. *Journal of Plant Physiology*. 160: 227- 237.

Abenavoli. M. R. Sorgonà, A. Muscolo, A. 2001. Morphophysiological changes in tissue culture of *Petunia hybrida* in response to the allelochemical coumarin. *Allelopathy Journal*. 8: 171–177.

Aksenova, N. P. Konstantinova, T. N. Golyanoskaya, S. A. 2012. Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 59: 451-466.

Anderson, J. M. 1986. Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoids membranes. *Annual Review of Plant Physiology*. 37: 93-136.

Arriaga, F. A. Ortiz, M. G. De la Cruz, G. G. Torres, Z. M. M. Trujillo, H. A. Mandujano, P. M. Aguilar A. I. Perales, V. H. V. Herrera R. D. Aguirre L. E. 2010. *Morfofisiología Vegetal. Un acercamiento práctico*. 2a ed. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. p. 73-76.

Aslam, A. Iqbal, J. 2010. Combined effect of cytokinin and sucrose on *in vitro* tuberization parameters of two cultivars i.e. Diamant and Red Norland of potato (*Solanum tuberosum*). *Pakistan Journal of Botany*. 42 (2): 1093-1102.

Ávalos, G. A. y Pérez U. C. E. 2009. Metabolismo secundario en plantas. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.

Avers C. J. y Goodwin R. H. 1956. Studies on roots. IV effects of coumarin and scopolentin on the standard root growth pattern of *Phleum pretense*. American Journal of Botany. 43: 612-620.

Bagni, N. Fracassini S. D. 1971. The effect of coumarin derivates on organogenesis and callus growth of *Cichorium intybus* roots and *Helianthus tuberosus* tubers *in vitro*. Experientia. 27 (10): 1239-1241.

Ballester, A. Vieitez, A. M. 1978. Estudio de potenciales alelopáticos en comunidades vegetales. Anales del Instituto Botánico A. J. Cavanilles. 34 (2): 713-722.

Benavides, M. A. 2003. Comentarios del artículo Jackson, S. D. 1999. Multiple signal pathways control tuber induction in potato. Plant Physiology. 119:1-8. Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Disponible en: <http://abenmen.com/a/tuberind.pdf> [accesado el 10 de septiembre del 2011].

Bettaieb, T. Denden, M. Mhamdi, M. 2008. Régénération *in vitro* et caractérisation physiologique de variantes somaclonales de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérants aux basses températures. Tropicultura. 26 (1): 10-16.

Bremner, P. M. Radley, R. W. 1966. Studies in potato agronomy. II. The effects of variety and time of planting on growth development and yield. Journal of Agricultural Science. 66: 253-262.

Blanco, Y. 2006. La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. Cultivos Tropicales. 27 (3): 5-16.

Calera, M. R. Mata, R. Anaya, A. L. Lotina H. B. 1995. 5-O-D-Galactopyranosyl-7-methoxy-3'4'-dihydroxy-4-phenyl-coumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. Photosynthesis Research. 40: 105-110.

Castro, F. A. Campostroni, E. Torres, N. A. Viana, L. H. 2011. Relationship between photochemical efficiency (JIP-Test parameters) and portable chlorophyll meter readings in papaya plants. Brazilian Journal of Plant Physiology. 23(4): 295-304.

Carretero, A. M. E. 2000. Compuestos fenólicos: Sikimatos (II). Panorama Actual del Medicamento. 24 (233): 432-435.

Colom, M. R. y Vazzana, C. 2003. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping love grass plants. Environmental and Experimental Botany. 46: 135-144.

Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. 2012. Monografía de la Papa. Gobierno del Estado de Veracruz. Disponible en: <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/MONOGRAFIA%20PAPA2010.PDF> [accesado el 5 de marzo del 2012].

Donnelly, D. J. Coleman, W. K. Coleman, S. E. 2003. Potato microtuber production and performance. American Journal Potato Research. 80: 103-115.

Einhelling, F. A. 1995. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. En Inderjit, D. K. M. M. Einhelling, F. A. (Eds) Allelopathy: Organisms, processes and applications. Volumen 582. American Chemical Society. Washington, DC. p. 96-116.

El-Sawy, A. Bekheet S. Ibrahim U. A. 2007. Morphological and molecular characterization of potato microtubers production on coumarin inducing medium. International Journal of Agriculture and Biology. 9 (5): 675-680.

Estrada, R. Schilde R, L. Espinoza, N. 1983. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 7: 3-10.

Ewing, E. E. Struik, P. C. 1992. Tuber formation in potato; induction, initiation and growth. Horticultural Reviews. 14: 89-197.

Food and Agriculture Organization, 2008. Las papas, la nutrición y la alimentación. Disponible en: <http://www.potato2008.org/es/lapapa/hojas.html> [accesado el 11 de julio del 2011].

Food and Agriculture Organization, 2008 (1). El cultivo. Disponible en: <http://www.potato2008.org/es/lapapa/cultivo.html> [accesado el 20 de octubre del 2012].

Gálvez, R. A. 2001. Producción de Papa (*Solanum tuberosum* L.) con la Técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales. INVERNAMEX. Saltillo, Coahuila, México. 15 p.

Ghavidel, R. A. Bolandi, A. R. Hamdi, H. Foroghiam, S. 2012. Effects of plant growth regulators and photoperiod *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) African Journal of Biotechnology. 11(53): 1158-11590.

Gómez, C. Arango, R. Arévalo, L. P. Delgado, C. Guzmán, M. R. León, S. M. Marentes, D. Correa, E. M., Vargas, S. 2003. Algunos estudios de alelopatía de *Rumex crispus* L. y *Polygonum segetum* HBK. en Colombia. Revista Corpoica. 4 (1): 42-48.

Gonçalves, J. F. C. Santos J. U. M. Nina, J. A. R. Chevreuil, L. R. 2007. Energetic flux and performance index in copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) and mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedlings grown under two irradiance environments. Brazilian Journal of Plant Physiology. 19 (3): 171-184.

González, M. S. Perales, V. H. Salcedo, A. M. O. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. Revista de Educación Bioquímica. 27 (4): 119-129.

Goodwin R. H. y Avers, C. J. 1950. The effect of coumarin derivatives on the growth of *Avena* root. American Journal of Botany. 37: 224-227.

Gopal, J. Chamail, A. Sarkar, D. 2005. Use of microtubers for slow-growth *in vitro* conservation of potato germoplasm. Plant Genetic Resources Newsletter. 141: 56-60.

Gopal, J. Chamail, A. Sarkar, D. 2004. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germoplasm: effect of genotype, abscisic acid and sucrose. *In vitro* Cellular Development Biology Plant. 40 (5): 485-490.

Hernández, T. M. G. Aguilar, M. I. King, D. B. Lotina, H. B. 2003. Inhibition of photosystem II in spinach chloroplast by trachyloban 19-oic-acid. Pesticide Biochemistry and Physiology. 77(1): 12-17.

Hossain, D. M. Li, J. Guo, S. Fujita, M. 2008. Suppressive effects of coumarins on pumpkin seedling growth and glutathione S-transferase activity. *Journal Crop Science Biotechnology*. 11(3): 187-192.

Hussain, M. I. González, L. Reigosa, M. J. 2010. Phytotoxic effects of allelochemical sand herbicides of photosynthesis, growth and carbon isotope discrimination in *Latuca sativa*. *Allelopathy Journal*. 26 (2): 157-174.

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

Krause, G. H. Weis, F. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.

Krauss, A. 1985. Interaction of nitrogen nutrition, phytohormones and tuberization. En: *Potato Physiology Ph. Li. Ed. Academic Press, Inc., Orlando*. p. 209-230.

Krüger, G. H. J. Tsimilli M. M. Strasser, R. J. 1997. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiologia Plantarum*. 101: 256-277.

Kupidlowska, E. Kowalec, M. Sulkowski, G. Zobel, A. M. 1994. The effect of coumarins on root elongation and ultrastructure of meristematic cell protoplast. *Annals of Botany*. 73: 525-530.

Liljana, K. G. Mitrev, S. Fidanka, T. Mite, I. 2012. Micropropagation of potato *Solanum tuberosum* L. *Electronic Journal of Biology*. 8(3): 45-49.

Macías, M. L. Rojas, I. S. Mata, R. Lotina H. B. 1999. Effect of selected coumarins on spinach chloroplast photosynthesis. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 47: 2137-2140.

Mani, F. Bettaieb, T. Zheni, K. Doudech, N. Hannachi, C. 2012. Effect of hydrogen peroxide and thiourea on fluorescence and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 8 (3): 61-71.

Martínez, R. J. C. 2002. Prueba de viabilidad de neutrófilos para la detección de sustancias tóxicas en extractos de plantas como fuente de alimento en los animales. Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencias Pecuarias. Posgrado Interinstitucional en Universidad de Colima. México. 91 p.

Maxwell, K. y Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51:659-668.

Mehovachi, T. 2004. Tubérisation sous stress salin de vitroplants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) *Biotechnology, Agronomic, Society and Environment*. 8 (1): 9-13.

Moreland, E. D. Novitzky, W. P. 1987 Effects of acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplast and mitochondria. En: Waller, G. R. (Ed) *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. ACS Symposium Series. Washington D.C., Estados Unidos. p. 247– 261.

Neuman, J. 1960. The nature of the growth-promoting action of coumarin. *Physiologia Plantarum*. 13 (2): 328-341.

Obata S. H. y Suzuki, H. 1979. Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiologia Plantarum*. 45: 320– 324.

Ochoa, N. M. G. 2012. El cultivo de papa en México. El Economista. Disponible en: <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2012/10/03/cultivo-papa-mexico> [accesado el 18 de octubre del 2012).

Ortiz, M. J. G. 1986. Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum* spp.) Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. ENEP Iztacala, UNAM. México. 56 p.

Ortiz, M. G. y Lozoya, S. H. 1987. Potato minitubers: Technology validation in Mexico. American Potato Journal. 64: 535-544.

O'Brien, P. J. O. Allen, E. J. Firman, D. M. A review of some studies into tuber initiation in potato (*Solanum tuberosum*) crops. Journal of Agricultural Science. 130: 251-270.

Perales, V. H. V. 2001. Efecto del estrés salino sobre los eventos primarios de la fotosíntesis en *Triticum aestivum* L. Tesis de maestría para obtener el título de Biología de los Recursos Vegetales. FES Iztacala, UNAM. México. 162 p.

Pérez, C. F. y Ormeño, N. J. 1991. Efecto de exudados de avenilla (*Avena fatua* L.) sobre plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) primaveral. Agricultura Técnica. 51 (2): 166-170

Prange, R. K. McRae, B. Midmore, D. J. Deng, R. 1990. Reduction in potato growth at high temperature: role of photosynthesis and dark respiration. American Potato Journal. 67: 327-369.

Rabotnikof, C. M. Petruzzi, H. J. Stritzler, N. P. 2005. Implantación de pasturas de mijo perenne. Efecto del enmalezamiento con cebollín. Boletín de Divulgación Técnica 88: 5-7.

Ripley, B. S. Redfan, S. P. Damos, J. 2004. Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient *Sorghum* by means of chlorophyll-a fluorescence kinetics. South African Journal of Science. 100: 615-618.

Rubio, C. O. A. Rangel, G. J. A. Flores, L. R. Magallanes, G. J. V. Díaz, H. C. Zavala, Q. T. E. Rivera, P. A. Cadena, H. M. Rocha, R. R. Ortiz, T. C. López, D. H. Díaz, V. M. Paredes, T. A. 2000. Manual para la producción de papas en las sierras y valles altos del centro de México. Libro técnico 1. División Agrícola. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INFAP. Centro de Investigación del Centro. SAGAR. 73 p.

Rzavi, S. M. 2011. Plant coumarins as allelopathic agents. International Journal of Biological Chemistry. 5 (1): 86-90.

Seabrook, J. E. A. y Coleman, S. 1988. Guidelines for shipping *in vitro* potato plantlets. American Potato Journal. 65: 301-308.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2012. Cierre de producción agrícola por cultivo. SAGARPA. México. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 [accesado el 2 de febrero del 2013]

Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados SIOVM. *Solanum tuberosum*. Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. CONABIO. 1-27 p. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20914_sg7.pdf [accesado el 11 de julio del 2011].

Stallknecht, G. F. Farnsworth, S. 1982. General characteristics of coumarin-induced tuberization of axillary shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. American Potato Journal. 59: 17-32.

Strasser, R. J. Srivastova, A. Tsimilli-Michael, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En: Yunus, M. Pather, U. Mohanly, P. (eds.) Proving Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation. Teyloran Francis, Londres. p. 445-483.

Strasser. R. J. Tsimilli, M. M. Srivastava A. Analysis of the fluorecence transient. 2004. p. 47. Disponible en: <http://www.hansatech-instruments.com/docs/analysis%20of%20the%20fluorecence%20transient.pdf> [accesado el 24 noviembre del 2012].

Svensson, S. 1972. The effect of coumarin on growth, production of dry matter, protein and nucleic acids in roots of maize and wheat and the interaction of coumarin with metabolic inhibitors. Physiologia Plantarum. 27 (1): 13-24.

Tugrul, S. y Samanci, B. 2001. Factors affecting tuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.). Potato Abstract. 26:86.

Valdés, L. O. 2005. Caracterización de los efectos del Cr y Mn en la fotosíntesis y en los niveles de pigmentos y osmolitos compatibles de *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata* y *Medicago sativa*. Tesis de licenciatura para obtener título de Biólogo. FES Iztacala, UNAM. 78 p.

Yeon, A. P. Park, S. Y. Lee, J. Jung, M. Kim, J. Sik, K. S. Youm, J. R. Beom, H. S. 2009. Simultaneous determination of five coumarins in *Angelicae dahuricae* Radix by HPLC/UV and LC-ESI-MS/MS. Biomedical Chromatography. 23: 1034-1043.

Efecto de la cumarina 1,2 benzopirona en el crecimiento de papa *Solanum tuberosum* var. Tollocan *in vitro*.

Zhou, Y. H. y Yu, J. Q. 2006. Allelopathy and photosynthesis. En: Allelopathy: A physiological process with ecological implications. Eds. Reigosa, M. J. Pedrol, N. González, L. Springer, Netherlands. p. 127-139.

Anexo I

Medio de propagación MS62 ajustado a papa Tollocan.

Solución A de elementos mayores

Compuesto	Fórmula	Gramos por litro
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ •7H ₂ O	3.7
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	1.7
Cloruro de calcio	CaCl ₂ •2H ₂ O	4.4
Nitrato de potasio	KNO ₃	19.0
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	16.5

Verter los compuestos en orden en 600 ml de agua destilada agitando constantemente. Esperar a que se disuelva el compuesto inicial para agregar el siguiente. Finalmente, aforar a 1 L. Guardar en frío.

Solución B de elementos menores

Compuesto	Fórmula	Miligramos por litro
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	620
Sulfato de manganeso	MnSO₄•4H₂O	2000
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ •7H ₂ O	830
Ioduro de potasio	KI	83
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	25 ml*
Sulfato de cobre	CuSO₄•5H₂O	2.5 ml*
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ •6H ₂ O	2.5 ml*

*Preparar solución stock (100 mg. de compuesto en 100 ml. de agua destilada) y tomar alícuota de la cantidad señalada.

Seguir el mismo procedimiento de la preparación de la solución A.

Solución C

Compuesto	Fórmula	Miligramos por litro
Sal de sodio del ácido etilendiaminotetraacético	Na ₂ EDTA	373
Sulfato de hierro	FeSO ₄ •7H ₂ O	278*

Para preparar el medio finalmente, se vierte un poco de agua en un vaso 600 ml. de agua destilada y se agrega en orden (A, B y luego C) agitando constantemente:

100 ml. de solución A, 10 ml. de solución B y 10 ml. de solución C. Posteriormente, agregar la parte orgánica.

Pate orgánica

Compuesto	
Tiamina HCl*	0.4 mg/l
Myo-Inositol	100 mg.
Sacarosa	60 g.

*Realizar solución stock de 1mg/ml con agua destilada.

Cuando estén todas las sales disueltas, aforar a 1 l con agua destilada y ajustar el pH. A 5.8. Después agregar 8g de agar y disolverlo calentando el medio.

Verter el medio en los tubos y esterilizarlos a 120°C y 15 lb. de presión por 15 minutos.

Anexo II

Prueba estadísticas paramétrica del índice raíz/vástago obtenidas con el programa SAS v 9.0 y con prueba de Diferencia mínima honesta significativa de Tukey:

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	18	22.56186046	1.25343669	15.78	<.0001
Error	76	6.03607533	0.07942204		
Total correcto	94	28.59793579			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.788933	46.58729	0.281819	0.604927

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
t	3	12.99917805	4.33305935	54.56	<.0001
b	4	2.95194375	0.73798594	9.29	<.0001
t*b	11	6.61073866	0.60097624	7.57	<.0001
cotb	18	22.56186046	1.25343669	15.78	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para tratamientos

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.92008	25	2
A	0.84072	20	1
A	0.70606	25	3
B	0.00000	25	4

Efecto de la cumarina 1,2 benzopirona en el crecimiento de papa *Solanum tuberosum* var. Tollocan *in vitro*.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para bloques

Tukey Agrupamiento	Media	N	b
A	0.83159	20	3
A	0.73498	20	1
B A	0.60709	20	4
B	0.46582	15	5
B	0.35038	20	2

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para combinación tratamiento bloque

Tukey Agrupamiento	Media	N	cotb
A	1.4119	5	33
B A	1.2483	5	11
B A C	1.1583	5	24
B A C	1.1267	5	31
B D A C	1.0418	5	22
B D A C	1.0291	5	13
E B D A C	0.9500	5	25
E B D A C	0.8854	5	23
E B D C	0.7258	5	14
E D F C	0.5650	5	21
E D F C	0.5443	5	34
E D F	0.4475	5	35
E F	0.3597	5	12
F	0.0000	5	32
F	0.0000	5	41
F	0.0000	5	42
F	0.0000	5	43
F	0.0000	5	44

Comparación de medias para la interacción Tratamiento*Bloque

Agrupamiento	Media	T*B
A	1.41188479	T1B2
A	1.24827012	T4B1
A	1.15827472	T2B4
A	1.12666261	T2B2
A	1.04178514	T4B2
A	1.02910532	T3B1
A	0.95001163	T1B4
A	0.8853528	T1B3
B	0.5649786	T3B2
B	0.54430789	T2B1
B	0.44746202	T3B4
B	0.35974414	T1B1
B	0.29363385	T3B3
B	0	T2B3
B	0	T4B3
B	0	T4B4
B	0	T5B1
B	0	T5B2
B	0	T5B3
B	0	T5B4

Anexo III

Pruebas estadísticas para la concentración de clorofilas obtenidas con el programa SAS v 9.0:

Clorofila a Kruskal-Wallis

Tests para normalidad Chla

Test	--Estadístico--	-----P-valor-----
Shapiro-Wilk	#11 X 0.735861	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D 0.27079	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 0.400218	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq 2.360465	Pr > A-Sq <0.0050

Procedimiento GLM

Variable dependiente: rany Rango para la variable y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	489.9333333	54.4370370	6.28	0.0058
Error	9	78.0666667	8.6740741		
Total correcto	18	568.0000000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	rany Media
0.862559	29.45178	2.945178	10.00000

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	4	369.8333333	92.4583333	10.66	0.0018
Días	1	104.7272727	104.7272727	12.07	0.0070
T*D	4	15.3727273	3.8431818	0.44	0.7751

Medias de cuadrados mínimos para el efecto t
t para H0: LSMean(i)=LSMean(j) / Pr > |t|

Variable dependiente: rany

i/j	1	2	3	4	5
1		2.425185 0.0383	3.005011 0.0148	4.479786 0.0015	5.665673 0.0003
2	-2.42518 0.0383		0.579826 0.5763	2.054601 0.0701	3.570449 0.0060
3	-3.00501 0.0148	-0.57983 0.5763		1.474775 0.1744	3.069511 0.0134
4	-4.47979 0.0015	-2.0546 0.0701	-1.47477 0.1744		1.795388 0.1062
5	-5.66567 0.0003	-3.57045 0.0060	-3.06951 0.0134	-1.79539 0.1062	

Cloroflila b Kruskal-Wallis

Tests para normalidad Chlb

Test	--Estadístico--	-----P-valor-----
Shapiro-Wilk	#11 X 0.691351	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D 0.32595	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 0.530184	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq 2.820756	Pr > A-Sq <0.0050

Procedimiento GLM

Variable dependiente: rany Rango para la variable y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	582.5500000	64.7277778	8.36	0.0013
Error	10	77.4500000	7.7450000		
Total correcto	19	660.0000000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	rany Media
0.882652	26.50461	2.782984	10.50000

Efecto de la cumarina 1,2 benzopirona en el crecimiento de papa *Solanum tuberosum* var. Tollocan *in vitro*.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	4	458.1250000	114.5312500	14.79	0.0003
Días	1	90.2500000	90.2500000	11.65	0.0066
T*D	4	34.1750000	8.5437500	1.10	0.4070

Medias de cuadrados mínimos para el efecto t
t para H0: LSMean(i)=LSMean(j) / Pr > |t|

Variable dependiente: rany

i/j	1	2	3	4	5
1		2.159699 0.0561	2.413781 0.0364	4.891083 0.0006	7.050782 <.0001
2	-2.1597 0.0561		0.254082 0.8046	2.731384 0.0211	4.891083 0.0006
3	-2.41378 0.0364	-0.25408 0.8046		2.477302 0.0327	4.637001 0.0009
4	-4.89108 0.0006	-2.73138 0.0211	-2.4773 0.0327		2.159699 0.0561
5	-7.05078 <.0001	-4.89108 0.0006	-4.637 0.0009	-2.1597 0.0561	

Relación Ch1a/Ch1b ANOVA Bloques

Tests para normalidad

Test	--Estadístico--	-----P-valor-----
Shapiro-Wilk	#11 X 0.919097	Pr < W 0.0558
Kolmogorov-Smirnov	D 0.179025	Pr > D 0.0453
Cramer-von Mises	W-Sq 0.092742	Pr > W-Sq 0.1359
Anderson-Darling	A-Sq 0.655919	Pr > A-Sq 0.0802

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: chlab

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	18	20.11798711	1.11766595	4.55	0.0507

Error 5 1.22889339 0.24577868

Total correcto 23 21.34688051

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE Ch1a/Ch1b Media
 0.942432 25.84929 0.495761 1.917889

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Días	3	0.44189879	0.14729960	0.60	0.6427
Tratamientos	4	10.38146119	2.59536530	10.56	0.0118
Días*Tratamientos	11	9.29462714	0.84496610	3.44	0.0918

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Ch1a/Ch1b

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 5
 Error de cuadrado medio 0.245779
 Valor crítico del rango estudentizado 5.67312
 Diferencia significativa mínima 1.2889
 Media armónica de tamaño de celdas 4.761905

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	2.3852	5	1
A	2.3775	5	2
A	2.3161	5	3
B A	1.6589	5	4
B	0.5851	4	5