



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

RESPUESTAS A LA APLICACIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO EN PAPA

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

DENEB SARAY MEDINA NUÑEZ



Bajo la supervisión de: Héctor Lozoya Saldaña, Ph.D.

DIRECCION GENERAL ACADÉMICA
CENTRO DE SERVICIOS ESCOLARES
COMITÉ DE EXAMENES PROFESIONALES

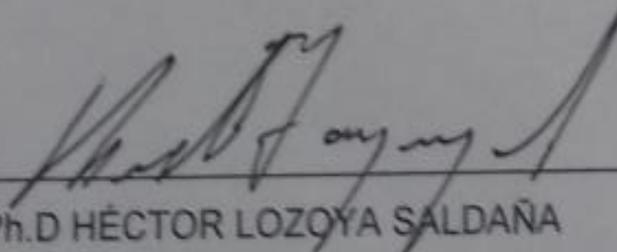


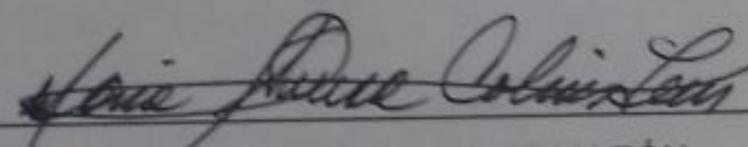
Chapingo, Edo. De México, Junio de 2017

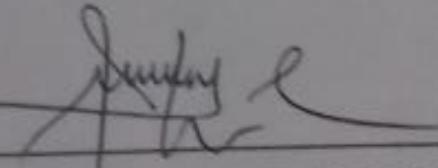
RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS A LA APLICACIÓN DE
DIOXIDO DE CARBONO EN PAPA

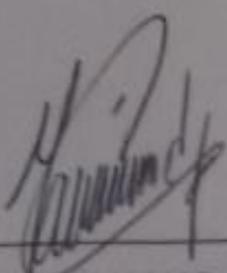
Tesis realizada por **DENEB SARAY MEDINA NUÑEZ** bajo la supervisión del
Coité Asesor, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: 
Ph.D HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR: 
Ph.D. MA. TERESA BERYL COLINAS Y LEÓN

ASESOR: 
DR. EFRAÍN CONTRERAS MAGAÑA

ASESOR: 
DR. MANUEL MANDUJANO PIÑA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	3
LISTA DE FIGURA	4
LISTA DE APENDICE	5
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
DATOS BIBLIOGRAFICOS	9
RESUMEN GENERAL	10
CAPÍTULO 1	11
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
CAPÍTULO 2	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1 Dióxido de carbono en las plantas	13
2.2 Dióxido de carbono en plantas C ₃	14
2.3 Respuestas en plantas de papa a la exposición de CO ₂	15
2.4 Respuestas Fisiológicas al CO ₂	17
2.5 Respuestas Bioquímicas	19
2.6 Literatura Citada	21
CAPÍTULO 3	27
3. RESPUESTAS BIOQUIMICAS Y FISIOLÓGICAS A LA APLICACION DE CO ₂ EN PAPA	27
3.1 RESUMEN	
3.2 Introducción	28
3.3 Materiales y métodos	30
3.3.1 Localización	30
3.3.2 Diseño experimental y de tratamientos	
3.3.3 Instalación para la aplicación de CO ₂	31
3.3.4 Muestreo	32
3.3.5 Mediciones Fisiológicas	32
3.3.6 Mediciones Bioquímicas	32
3.4 Resultados y discusión	36
3.4.1 Tasa fotosintética	36
3.4.2 Conductancia Estomática	39
3.4.3 Tasa de transpiración	41
3.4.4 Concentración intercelular de CO ₂	43
3.4.5 Azúcares Totales y Reductores	46
3.4.6 Clorofila	51
3.4.7 Fenoles	53
4.4 Conclusiones	55
4.5 Bibliografía	55
APENDICES	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de medias para tasa de fotosíntesis (fot).	60
cuadro 2. Comparación de medias para conductancia estomática (cond).	62
cuadro 3.comparación de medias para tasa de transpiración (tran)	63
cuadro 4. Comparación de medias para concentración intercelular de CO_2 (ci)	66
cuadro 5.comparación de medias para azúcares totales (azu t)	68
cuadro 6. Comparación de medias para azúcares reductores (azu r)	70
cuadro 7. Comparación de medias para clorofila total (clor)	72
cuadro 8.comparación de medias para fenoles (fen)	74
cuadro 9. Análisis de varianza de tasa fotosintética (fot)	76
cuadro 10.análisis de varianza de conductancia (cond)	77
cuadro 11.análisis de varianza de tasa de transpiración (tran)	78
cuadro 12.análisis de varianza de concentración intercelular de CO_2(ci) ...	79
cuadro 13.análisis de varianza de azúcares totales (azu t)	80
cuadro 14.análisis de varianza de azúcares reductores (azu r)	81
cuadro 15.análisis de varianza de clorofila total (clor)	82
cuadro 16.análisis de varianza de fenoles (fen)	83

LISTA DE FIGURA

figura 1. Tasa de fotosíntesis.....	27
figura 2. Conductancia estomática	29
figura 3. Tasa de transpiración.....	31
figura 4. Concentración intercelular de CO ₂	34
figura 5. Azucares totales.....	37
figura 6. Azucares reductores.....	38
figura 7. Clorofila total.....	40
figura 8. Contenido fenoles	42

LISTA DE APENDICE

APÉNDICE 1. APENDICE 1. COMPARACIÓN DE MEDIAS..... 60
APENDICE 2. ANÁLISIS DE VARIANZA..... 76

DEDICATORIA

A mi hijo Santiago, Daniel, mis padres y suegros con afecto, gratitud y reconocimiento en su labor de entregarme siempre amor, cariño, apoyo y confianza.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y al instituto de horticultura que sin su disposición este proyecto no se haya podido realizar, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico proporcionado que permitió realizar la investigación.

Reconozco el apoyo brindado por el Dr. Héctor Lozoya Saldaña quien confió en mí y me dio la oportunidad de colaborar en su proyecto justo cuando estaba pasando por una situación delicada (embarazo), agradezco la paciencia, apoyo y comprensión en cada una de las situaciones difíciles que se presentaron durante el proyecto.

Agradezco al Dr. Efraín Contreras Magaña y la Dra. Ma. Teresa B. Colinas por el tiempo, aporte de conocimiento y sus apreciables consejos que permitieron mejorar el presente trabajo, sin dejar de mencionar las sugerencias y oportunas recomendaciones del Dr. Manuel Mandujano Piña.

Al Ingeniero Cecilio, don Chebo, Ángel, Don Ángel que me ayudaron a establecer, cuidar y culminar con éxito el experimento; Mariela y Alex que fueron pieza clave para las decisiones estadísticas y además contribuyeron en los muestreos, aplicaciones de CO₂ y actividades de laboratorio sin olvidar a Don Toño, Eddi, Diego, Gaby, Monserrat, Cristian, “Eliber-tinaje”, Betsabé, Wilber, Jonathan (PROFONI), Adela, Yesi, Monse (PROFONI), Abraham, Bruno, Meche y Tomasita que colaboraron en diferentes etapas del proyecto, toleraron mis crisis de estrés y que contribuyeron para que mi estancia en Chapingo se haya vuelto satisfactoria e inolvidable, Gracias.

Con amor, agradezco a Daniel por ser una excelente pareja de vida, cuidar de Santiago en mi ausencia y siempre apoyarme en todas las locuras que se me ocurren, sin su confianza, motivación y paciencia no haya sido posible culminar la maestría, te amo.

DATOS BIOGRAFICOS

Datos Personales

Nombre: Deneb Saray Medina Núñez

Fecha de nacimiento: 28 de Julio de 1988

Lugar de nacimiento: Escuinapa, Sinaloa

CURP: MEND880728MSLDXN03

Profesión: Ingeniera Bioquímica

Cédula profesional: 7095871

Desarrollo académico

Preparatoria: Centro de Estudios Tecnológicos del Mar

Licenciatura: Instituto Tecnológico de Tepic

RESPUESTAS A LA APLICACIÓN DE DIOXIDO DE CARBONO EN PAPA RESPONSES TO CARBON DIOXIDE APPLICATION IN POTATOES

Deneb Saray Medina¹, Héctor Lozoya Saldaña²

RESUMEN GENERAL

La fijación del CO₂ es un factor clave en fotosíntesis. Considerando el relativamente bajo contenido de este gas en la atmósfera (0.03-0.04 %, o de 300 a 400 ppm), se han desarrollado un gran número de estudios para dilucidar si la exposición de las plantas de papa a CO₂ adicional pudiera también traer beneficios adicionales en su funcionamiento. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar algunos cambios fisiológicos en plantas de papa, var. Agata, expuestas a diferentes concentraciones (700, 1,000 y 1,200 ppm) y tiempos (5, 10, 15 min) de CO₂ exógeno, una vez por semana cinco veces durante el ciclo de crecimiento, bajo confinamiento. Si hubo respuestas de las plantas expuestas al gas con respecto a los testigos en algunas variables, con mayor influencia de los factores dosis/tiempo una hora después de la aplicación. A las 24 h posteriores, algunos de los tratamientos se diluyeron con mayores similitudes estadísticas entre ellos para fotosíntesis. De igual manera, la edad de la planta influyó en la intensidad de respuesta, siendo mayor entre 35 y 50 días desde la siembra, para tasa fotosintética, la concentración intercelular del CO₂ y azúcares, mientras que para conductancia estomática y transpiración fue mayor de los 60 a los 70 días, con poca influencia de los tratamientos. De los 60 días en adelante, no hubo diferencias entre tratamientos en el contenido de azúcares, y las clorofilas se mantuvieron constantes a lo largo del ciclo. Hubo inconsistencias con los fenoles, sin diferencias entre tratamientos a los 35-50 días, después de 1 hr de la aplicación, incrementándose al final del ciclo al igual que el testigo sin exposición al gas. La tasa fotosintética fue la única variable que se vio favorecida por la mayor dosis del gas a lo largo del ciclo. Se concluye que la exposición de plantas de papa al CO₂ exógeno ejerció acciones diversas en las variables incluidas, sin proporción con la combinación dosis/tiempo.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, CO₂, Fotosíntesis.

¹Autor

²Director de Tesis

GENERAL ABSTRACT

CO₂ fixation is a key factor in photosynthesis. Considering the relatively low content of this gas in the atmosphere (0.03-0.04 %, 300-400 ppm), a large number of studies have been conducted to find out whether the exposure of potato plants to additional CO₂ may also bring additional growth benefits. The objective of this work was to quantify some physiological changes in potato plants, cv. Agata, exposed to different concentrations (700, 1,000, 1,200 ppm) and exposure times (5, 10, 15 min) of exogenous CO₂ once a week for five weeks throughout the growing cycle, under confinement. There were some reactions in the plants exposed to the gas relative to the controls in several variables, with higher influence of the dosage/exposure time factors one hour after the application. At 24 hr later, some of the treatments were diluted with a wider distribution of statistical similarities among them for photosynthesis. Similarly, plant age was a factor in the intensity of the reaction, with higher values at 35-50 days after planting (dap) for photosynthetic rate, intercellular CO₂ content, and sugars, while for stomatal conductance and transpiration the values were higher at 60-70 days, with little influence of the treatments. From 60 days on, there were no differences among treatments in sugar content, and chlorophyll remained constant throughout the cycle. Phenol contents were inconsistent, with no differences among treatments at 35-50 dap and one hour after the exposure, but increasing at the end of the cycle, same as the control with no exposure to the gas. Photosynthetic rate was the only variable favored by the highest gas dosage over the cycle. It is concluded that exposure of potato plants to exogenous CO₂ promoted diverse reactions in the variables studied, with no relationship to the dosage/exposure time combination.

Key words: *Solanum tuberosum*, CO₂, photosynthesis.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El proceso de tuberización en papa (*Solanum tuberosum*) es influenciado por factores ambientales e intrínsecos; entre los que destacan el genotipo, la concentración interna de AG3, fotoperiodo, temperatura y radiación interceptada por la planta. Algunos de los factores que pueden ser manipulados para incrementar la producción de mini tubérculos en invernadero son: momento de inicio de fertilización, solución nutritiva y su composición, densidad de plantación, arreglo espacial de las plantas y diámetro mínimo de los tubérculos a ser cosechados (Struik y Wiersema, 1999) y actualmente existe evidencia que el uso de CO₂ exógeno provoca mayor rendimiento en la producción de tubérculos (Davidson y Xie, 2014).

En los últimos años el interés del productor se ha centrado en una serie de atributos de calidad en los tubérculos semilla de papa. Estos atributos son valorados según las características fisiológicas y fitosanitarias que permitan tener una producción segura y evitar la alta tasa de degeneración de la semilla en el campo, por lo que generalmente la semilla no se puede reproducir por más de 3 generaciones (Rubio *et al.*, 2006).

De acuerdo a Flores *et al.*,(2009) la producción en invernadero de semilla básica de papa (*Solanum tuberosum*) se realiza con el propósito de obtener semilla libre de enfermedades, que muestre todo su potencial de producción en campo, tanto para semilla, como para la producción comercial de este tubérculo, por ello se requieren tubérculos mayores de 10 mm de diámetro que

ya puedan ser cultivados en campo, aseguren la emergencia y mayor cantidad de tallos por metro lineal para así lograr el establecimiento adecuado del cultivo y la mayor productividad del mismo.

Debido a lo anterior surge la necesidad de un sistema de producción de semillas que cubra las nuevas tendencias, tal es el caso del cultivo in vitro que se realiza exclusivamente por medio de la micro propagación siguiendo protocolos desarrollados en la década de los 80. (Rigato *et al.*, 2003), el uso de invernaderos que consiste en un sistema de aclimatación forzada con la finalidad de aumentar los rendimientos, procurando mantener las condiciones del invernadero (Rubio, 2000) y la aplicación de CO₂ exógeno que de acuerdo a estudios realizados por (Miglietta *et al.*, 1998; Bunce, 1999; Schapendonk *et al.*, 2000; Lawson *et al.*, 2001; Fangmeier *et al.*, 2002; Conn y Cochran, 2006; Fleisher *et al.*, 2008a.) existe evidencia de un aumento de la producción de materia seca en tubérculos al incrementar la concentración de CO₂ ambiental.

En este contexto, el uso de CO₂ aplicado de manera exógena representa una técnica alternativa en el país y genera la necesidad de evaluar las respuestas bioquímicas y fisiológicas en papa a diferentes concentraciones y periodos de aplicación de CO₂.

El objetivo de este estudio estuvo enfocado a estudiar respuestas bioquímicas y fisiológicas, inducidas por aplicación exógena de dióxido de carbono (CO₂) en plantas de papa (*Solanum tuberosum*).

CAPÍTULO 2

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Dióxido de carbono en las plantas

Las plantas están formadas por materia orgánica, de tal manera que existe una relación directa entre la cantidad de bióxido de carbono que se haya fijado y la cantidad de biomasa producida. Por lo tanto, es de importancia básica una comprensión de la fijación del bióxido de carbono y su metabolismo hacia los productos iniciales de la fotosíntesis (Coombs *et al.*, 1988).

La concentración de CO₂ en el aire alrededor de las hojas afecta marcadamente la fotosíntesis. Normalmente, el contenido promedio de la atmosfera es de 0.03 % y 21 % de O₂. Los fisiólogos han encontrado que al incrementar la concentración de CO₂ a 0.10% en un sistema cerrado (como invernadero sellado o cámara de plástico acrílico) se duplica la tasa fotosintética de algunos cultivos como trigo, arroz, soya, algunos vegetales y frutales. Muchos cultivos de invernadero como claveles, orquídeas y rosas, se desarrollan comercialmente en atmosferas enriquecidas con CO₂. Puede incrementarse la concentración de CO₂ en el laboratorio o invernadero, pero aún no se puede hacer comercialmente para cultivos de campo (Lira, 2007).

Al considerar las limitaciones de alimentos para la creciente población del mundo y en virtud de la necesidad de producir más cosechas, sin necesidad de fertilizantes y energéticos como combustibles, urge mejorar rendimientos de los cultivos comerciales, elevando las cantidades de CO₂ para las plantas; lo cual puede lograrse manipulando la densidad de plantación y la altura del follaje, para incrementar así la tasa de difusión de CO₂ y, a su vez, su concentración alrededor de las hojas. Las aplicaciones de materia orgánica en forma de

residuos de cosecha, o follaje incorporado en verde al suelo, tienden a incrementar los niveles de CO₂ en la atmosfera superficial del suelo. En un día caliente y soleado, después de un periodo lluvioso y sin movimiento del aire, algunas plantas crecen tan rápido que se limita la disponibilidad del CO₂ en la superficie de las hojas. Bajo esas condiciones, en algunos países se utilizan grandes abanicos para aumentar la cantidad de CO₂ mezclado con aire, mediante su recirculación (Salisbury y Ross, 1944; Coombs *et al.*, 1988 y Lira, 2007).

Las características de las plantas superiores respecto a sus patrones de asimilación de CO₂ han conducido a su clasificación en tres grupos diferentes, conocidos ahora como plantas C3, C4 Y CAM. A las primeras dos se les asignó ese nombre por corresponder al primer compuesto que se marca radiactivamente cuando las plantas se exponen a bióxido de carbono radioactivo (Salisbury y Ross, 1994).

2.2 Dióxido de carbono en plantas C3

La planta de papa presenta vía fotosintética C3 (Mackerron y Waister, 1983; Dwelle *et al.*, 1983) debido a que el primer producto estable de la asimilación de CO₂ es el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) (Coombs *et al.*, 1988). Que forma parte del proceso del ciclo de reducción del carbono, la reacción general de este ciclo se puede considerar como resultado de una serie de cuatro procesos separados:

- (1) La carboxilación del bisfosfato de ribulosa para formar dos moléculas de 3-PGA.

- (2) La reducción del 3-PGA en el nivel de carbohidrato a la forma de azúcares de tres carbonos, principalmente fosfato de dihidroxiacetona (DHPA).
- (3) La regeneración del aceptor primario de CO₂, ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP).
- (4) La formación neta de carbohidrato, que puede ser almacenado como almidón, puede salir del cloroplasto para ser utilizado en la construcción de nuevo material celular, proporcionando energía para otros procesos metabólicos a través de la respiración, o ser translocado a órganos de almacenamiento. (Coombs *et al.*, 1988).

En plantas C-3 se reporta que con el aumento de CO₂ en el aire incrementa la tasa de fotosíntesis la cual casi siempre llega a cero a concentraciones entre 25 y 45 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Taiz y Zeiger, 2006).

2.3 Respuestas en plantas de papa a la exposición de CO₂

Existe reciente interés en la comprensión de las respuestas de las plantas a los cambios en las concentraciones de CO₂ en ambientes protegidos y al aumento de las concentraciones de CO₂ asociado a otros factores, como: H₂O, nutrientes, luz, temperatura, así como la edad y genética de la planta.

Estas respuestas provocadas por dichos cambios tendrán profundos efectos sobre el crecimiento y la productividad de las plantas (Salisbury y Ross, 1994); aunado a lo anterior surgen una serie de investigaciones para conocer las respuestas en plantas de papa sometidas a diferentes concentraciones de CO₂ y cambios en alguno de los factores antes mencionados. En experimentos realizados por Wheeler *et al.*, 1991. Utilizando los cultivares de papa (*Solanum*

tuberosum), Norland, Russet Burbank y Denali y manteniendo los niveles de dióxido de carbono a 350 y 1000 ppm los cuales se aplicaron en combinación con fotoperiodos de 12 y 24 h a 400 y 800 micromoles $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ encontraron que el enriquecimiento con CO_2 en combinación con dos fotoperiodos y dos niveles de radiación aumentó el rendimiento del tubérculo y el peso seco total de la planta, de igual forma (Sicher & Bunce, 1999) encontraron en tratamientos de baja, media y alta concentración de CO_2 respectivamente, que los rendimientos de la materia seca de los tubérculos aumentaron 9 y 40%, respectivamente, en los tratamientos de media y alta concentración comparados con el tratamiento con baja concentración de CO_2 .

Así mismo (Katny *et al.*, 2005) observaron que bajo exposición prolongada a CO_2 elevado, la fotosíntesis aumentó entre 10% y 40% en comparación con el CO_2 ambiental, estos mismos autores encontraron evidencia clara de que las hojas de diferente edad varían en sus respuestas a los cambios en la concentración atmosférica de CO_2 .

(Chapman, 1951) determinaron que el nivel general de absorción de CO_2 por las hojas de papa fue aumentado con el incremento de la humedad del suelo al mismo tiempo observaron que el marchitamiento de las hojas causó una disminución en la tasa de absorción de CO_2 .

(Fangmeier *et al.*, 2002) estudiaron el efecto de la combinación de CO_2 y ozono a concentración elevada en las concentraciones la absorción de nutrientes plantas de papa, encontrando que bajo CO_2 elevado, casi todos los nutrientes tendían a disminuir en concentración.

2.4 Respuestas fisiológicas al CO₂

Conductancia estomática

La conductancia estomática es una medida de la apertura estomática (Ortega, 1984). Las plantas tienen hojas formadas por una epidermis compuesta de una cutícula relativamente impermeable y válvulas operadas por turgencia: los estomas, mismas que desempeñan el papel en el control del equilibrio entre la pérdida de agua y la ganancia de carbono; esto es, la producción de biomasa. La medición del tamaño de la apertura (apertura estomática), o la resistencia a la transferencia de CO₂ y vapor de agua (H₂O) entre la atmósfera y el tejido interno foliar, impuesta por los estomas (Coombs *et al.*, 1988) que es de importancia en muchos estudios de producción de biomasa. Este es el caso de estudios realizados por Nieto, 2008 donde se evalúa el efecto de las altas concentraciones de CO₂ en la conductancia estomática, mismo estudios que reportan un cambio en dicha variable.

La conductancia estomática se puede calcular de las tasas de pérdida de vapor de agua. La forma más exacta es midiendo la pérdida de vapor de agua de hojas encerradas en cámaras foliares, empleando técnicas de intercambio de gases (Coombs *et al.*, 1988).

Tasa de transpiración

La transpiración es la evaporación del agua de las plantas. Los factores que influyen en la tasa transpiratoria y por tanto en la apertura estomática son el déficit de presión de vapor, que existe entre la atmósfera y las cavidades aéreas

del mesófilo, la luz (calidad y cantidad), el CO₂ ambiental, la temperatura de la hoja, el estado hídrico del suelo y la presencia de contaminantes en el aire (Jones, 2013). Christmann *et al.*, (2007) recientemente han comprobado que la señal para el cierre estomático viene de las raíces y por tanto depende principalmente del contenido de agua del suelo.

La transpiración es considerada un proceso secundario inevitable, resultado de la necesidad de la apertura estomática para realizar fotosíntesis en horas del día en la cual el déficit de presión de vapor es mayor (Sandvik *et al.*, 1987; Larcher 2003), lo cual se asocia a los resultados obtenidos por Kumari *et al.*, 2015; que estudiaron las respuestas en la tasa de transpiración que presentaron relación con los cambios en la conductancia estomática, esto en plantas de papa expuestas a cambios en la concentración de CO₂.

Concentración intercelular de CO₂

Las células de los estomas detectan la concentración de CO₂ dentro de la hoja, es decir, en los espacios intercelulares, en lugar de por fuera de la hoja. Más específicamente, la mayoría de los estudios asumen que las células guarda perciben y responden sólo a la concentración de CO₂ denominada como intercelular (Mott, 1988 y Onandia *et al.*, 2011).

Kumari, 2015 demostró como la concentración intercelular en plantas de papa se miró afectada al exponerlas a concentraciones de CO₂ por periodos prolongados, además (Nieto, 2008) encontró un incremento de la concentración intercelular en trigo a medida que aumentó la concentración de CO₂ ambiental en los experimentos, usando trigo.

Fotosíntesis

Las tasas fotosintéticas se ven amplificadas por mayores concentraciones de CO_2 . El aumento de CO_2 en el aire incrementa la fotosíntesis en una planta C3 a tres diferentes niveles de irradiancia. En este caso, el CO_2 adicional hace disminuir la fotorrespiración incrementando la proporción de CO_2 con respecto al O_2 en la reacción con la rubisco, la fotorrespiración disminuye con el aumento en la proporción de CO_2 a O_2 , lo que provoca una fotosíntesis neta más rápida, a concentraciones altas de CO_2 , los niveles de irradiancia elevados hacen aumentar la fotosíntesis más que las concentraciones bajas de CO_2 y que, para saturar la fotosíntesis se requiere una concentración de CO_2 superior con niveles de irradiancia elevados que con niveles bajos (Edwards *et al.*, 1983).

La fotosíntesis neta de las especies C3 casi siempre llega a cero a concentraciones de CO_2 entre 35 y 45 (Bauer y Martha, 1981). La concentración de CO_2 a la que la fijación fotosintética justo equilibra la pérdida por respiración se denomina punto de compensación de CO_2 (Salisbury & Ross, 1994).

2.5 Respuestas Bioquímicas

Clorofila total

A medida que las hojas crecen, su capacidad para fotosintetizar se incrementa hasta que se desarrollan por completo; entonces esta capacidad empieza a disminuir con lentitud. Las hojas viejas, senescentes, terminan por tornarse amarillas e incapaces de fotosintetizar a causa de la degradación de la clorofila y la pérdida de cloroplastos funcionales. Diversos factores controlan la síntesis

de clorofilas durante el crecimiento, asociado a la síntesis de clorofilas esta la nutrición; el contenido de nitrógeno se relaciona estrechamente con la capacidad fotosintética, ya que el nitrógeno que constituye la clorofila, proteínas del tilacoide y enzimas (principalmente Rubisco) que representa alrededor de 75% del nitrógeno orgánico en la hoja (Salisbury & Ross, 1994).

Existen estudios (Katny *et al.*, 2005) donde incrementaron la concentración de CO₂ para mejorar la tasa fotosintética, contenido de azúcares entre otras variables encontrando que a medida que esta aumenta la demanda de nutrientes también se hace presente una disminución de la cantidad de clorofila total, debido a la estrecha relación entre demanda de nutriente y aumento de CO₂.

Azúcares reductores y totales

Cuando hay un exceso de dióxido de carbono en el ambiente, las plantas C3 lo acumulan más. Así, este gas, al ser abundante, permite que las plantas sinteticen más glucosa. Esto quiere decir que se esperaría que en concentraciones muy altas de dióxido de carbono, las plantas con metabolismo C3 se vean beneficiadas en cuanto a crecimiento y reproducción (Pérez *et al.*, 2015). Las especies que tienen tasas fotosintéticas elevadas también tienen tasas de translocación relativamente elevadas, lo que sugiere que un transporte efectivo de productos fotosintéticos mantiene una fijación de CO₂ rápida.

Fenoles

Los fenoles son compuestos que pertenecen a un grupo de los metabolitos secundarios, los cuales provienen de la ruta del ácido shikímico, responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles en las plantas (Taiz & Zeiger,

2006) y que tienen relación con los mecanismos de defensa de las plantas cuando estas son sometidas a estrés de origen abiótico como el caso de CO₂ presente a concentraciones superiores a las ambientales (Kumari, 2015). La exposición de la planta a altos niveles de CO₂ puede aumentar la producción de Metabolitos y antioxidantes (Ibrahim *et al.*, 2012).

2.6 LITERATURA CITADA

- Bauer, H., & Martha, P. (1981). The CO₂ Compensation Point of C3 Plants-A Re-Examination I. Interspecific Variability. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 03(5), 445-450.
- Bunce, J. A. (2004). Carbon dioxide effects on stomatal responses to the environment and water use by crops under field conditions. *Oecologia*, 140(1), 1-10.
- Chapman, H. W. (1951). Absorption of CO₂ by leaves of the potato. *American Journal of Potato Research*, 28(5), 602-615.
- Christmann, A., Weiler, E. W., Steudle, E., & Grill, E. (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal*, 52(1), 167-174.
- Coombs, J. (1988). Metabolismo del carbono. In COOMBS, J. (Eds.) Técnicas en fotosíntesis y bioproductividad 2ed., pp 116-130. *Colegio de Postgraduados*. Chapingo, Méx.
- Conn, J. S., & Cochran, V. L. (2006). Response of potato (*Solanum tuberosum*) to elevated atmospheric CO₂ in the North American Subarctic. *Agriculture, ecosystems & environment*, 112(1), 49-57.

- Davidson, R.D. & Xie, K.Y. 2014. Seed potato production. In: Navarre, R.; Pavek, M.J. (Eds.). The potato: Botany, production and uses. *Wallingford (UK). CAB International*. ISBN 9781780642802. pp. 115-132.
- Dwelle, R. B., Hurley, P. J., & Pavek, J. J. (1983). Photosynthesis and Stomatal Conductance of Potato Clones (*Solanum tuberosum* L.) Comparative Differences in Diurnal Patterns, Response to Light Levels, and Assimilation through Upper and Lower Leaf Surfaces. *Plant Physiology*, 72(1), 172-176.
- Edwards, G., & Walker, D. (1983). C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. *Univ of California Press*.
- Fangmeier, A., De Temmerman, L., Black, C., Persson, K., & Vorne, V. (2002). Effects of 28elevated CO₂ and/or ozone on nutrient concentrations and nutrient uptake of potatoes. *European Journal of Agronomy*.17(4), 353-368.
- Fleisher, D. H., Timlin, D. J., & Reddy, V. R. (2008). Elevated carbon dioxide and water stress effects on potato canopy gas exchange, water use, and productivity. *Agricultural and forest meteorology*.148(6), 1109-1122.
- Flores-López, R., Sánchez-del Castillo, F., Rodríguez-Pérez, J. E., Mora-Aguilar, R., Colinas-León, M. T., & Lozoya-Saldaña, H. (2009). Influencia de la radiación solar en la producción de semilla-tubérculo de papa bajo cultivo sin suelo. *Revista Chapingo Serie horticultura*, 15(1), 25-30.
- Jones, H. G. (2013). Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology (3ra. pp 2-35) Cambridge university press,

- Ibrahim, M. H., & Jaafar, H. Z. (2012). Impact of elevated carbon dioxide on primary, secondary metabolites and antioxidant responses of *Eleais guineensis* Jacq. (Oil Palm) seedlings. *Molecules*, 17(5), 5195-5211.
- Katny, M. A. C., Hoffmann-Thoma, G., Schrier, A. A., Fangmeier, A., Jäger, H. J., & van Bel, A. J. (2005). Increase of photosynthesis and starch in potato under elevated CO₂ is dependent on leaf age. *Journal of plant physiology*, 162(4), 429-438.
- Kumari, S., Agrawal, M., & Singh, A. (2015). Effects of ambient and elevated CO₂ and ozone on physiological characteristics, antioxidative defense system and metabolites of potato in relation to ozone flux. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 276-287.
- Larcher, W. (2003). Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups (4 ta. pp 51-118). *Springer Science & Business Media*.
- Lawson, T., Craigon, J., Tulloch, A. M., Black, C. R., Colls, J. J., & Landon, G. (2001). Photosynthetic responses to elevated CO₂ and O₃ in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Physiology*, 158(3), 309-323.
- Lira, S. R. H. (2007). Fotosíntesis y ambiente. In Fotosíntesis y ambiente Lira, R., (Ed.) *Fisiología vegetal* (2da., pp 141-158). Trillas.
- MacKerron, D. K. L., & Waister, P. D. (1983). Light interception and dry matter accumulation in potato cultivars of contrasting habit. *Potato Research (UK)*. 26, 88- 89.

- Miglietta, F., Magliulo, V., Bindi, M., Cerio, L., Vaccari, F. P., Loduca, V., & Peressotti, A. (1998). Free air CO₂ enrichment of potato (*Solanum tuberosum* L.): development, growth and yield. *Global Change Biology*, 4(2), 163-172.
- Mott, K. A. (1988). Do stomata respond to CO₂ concentrations other than intercellular. *Plant Physiology*, 86(1), 200-203.
- Nieto, A. (2008). Mecanismos de aclimatación de la asimilación fotosintética de carbono a los aumentos de CO₂ y temperatura del aire en el trigo (pp. 7-29).
- Onandia, G., Olsson, A. K., Barth, S., King, J. S., & Uddling, J. (2011). Exposure to moderate concentrations of tropospheric ozone impairs tree stomatal response to carbon dioxide. *Environmental Pollution*, 159(10), 2350-2354.
- Ortega Delgado, M. L., & Rodríguez Coquiez, C. (1979). Estudio de carbohidratos en variedades Mexicanas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. y *Phaseolus coccineus* L.). *Agrociencia*, 32(3), 167-176.
- Pérez, M. M. B., Rodríguez, J. H. T., & Ibatá, M. D. V. (2015). Exceso de dióxido de carbono en la atmósfera y las plantas: ¿amigo o enemigo? *Biodiversidad Colombia*, (5), 29-38.
- Rigato, S., Gonzalez, A., & Huarte, M. (2003) Analítico: Producción de plantulas de papa a partir de técnicas combinadas de micropropagación e hidroponía para la obtención de semilla prebasica. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 12(1), 110-120.

- Rubio, C. O. 2000. Manual para la producción de papa en las Sierras y Valles Altos del Centro de México. SAGAR. INIFAP. CIRCE. Campo Exp. Valle de Toluca. Libro Técnico No. 1. Zinacantepec, México. 80 pp
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W., (1994). In fijación de dióxido de carbono y síntesis de carbohidratos (Eds.) Fisiología vegetal(1ª Ed.). México DF: *Grupo Editorial Iberoamérica*.249-273 pp.
- Sandvik, A. K., Waldum, H. L., Kleveland, P. M., & Søgne, B. S. (1987). Gastrin produces an immediate and dose-dependent histamine release preceding acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. *Scandinavian journal of gastroenterology*,22(7), 803-808.
- Schapendonk, A. H., van Oijen, M., Dijkstra, P., Pot, C. S., Jordi, W. J., & Stoop, G. M. (2000). Effects of elevated CO₂ concentration on photosynthetic acclimation and productivity of two potato cultivars grown in open-top chambers.*Functional Plant Biology*, 27(12), 1119-1130.
- Sicher, R. C., & Bunce, J. A. (1999). Photosynthetic enhancement and conductance to water vapor of field-grown *Solanum tuberosum* in response to CO₂ enrichment. *Photosynthesis Research*,62(2), 155-163.
- Struik, P. C., & Wiersema, S. G. (1999).Seed potato technology. Production of pre-basic seed. Struik, P. C., & Wiersema, S. G (Eds.) Wageningen Academic (pp. 175- 206).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006).Fotosíntesis: las reacciones del carbono. In Taiz, L., & Zeiger, E. (Eds.) Fisiología vegetal (3ed, pp. 269-287). D.L.: Universitat Jaume I.

Wheeler, R. M., Tibbitts, T. W., & Fitzpatrick, A. H. (1991). Carbon dioxide effects on potato growth under different photoperiods and irradiance. *Crop Science*, 31(5), 1209-1213.

CAPÍTULO 3

ALGUNAS ALTERACIONES FISIOLÓGICAS EN PAPA POR ENRIQUECIMIENTO CON CO₂ SOME PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS IN POTATO UNDER CO₂ ENRICHMENT

Deneb Saray Medina Nuñez¹, Héctor Lozoya-Saldaña²

RESUMEN

La fijación del CO₂ es un factor clave en fotosíntesis. Considerando el relativamente bajo contenido de este gas en la atmósfera (0.03-0.04 %, o de 300 a 400 ppm), se han desarrollado un gran número de estudios para dilucidar si la exposición de las plantas de papa a CO₂ adicional pudiera también traer beneficios adicionales en su funcionamiento. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar algunos cambios fisiológicos en plantas de papa, var. Agata, expuestas a diferentes concentraciones (700, 1,00 y 1,200 ppm) y tiempos (5, 10, 15 min) de CO₂ exógeno, una vez por semana cinco veces durante el ciclo de crecimiento, bajo confinamiento. Si hubo respuestas de las plantas expuestas al gas con respecto a los testigos en algunas variables, con mayor influencia de los factores dosis/tiempo una hora después de la aplicación. A las 24 h posteriores, algunos de los tratamientos se diluyeron con mayores similitudes estadísticas entre ellos para fotosíntesis. De igual manera, la edad de la planta influyó en la intensidad de respuesta, siendo mayor entre 35 y 50 días desde la siembra, para tasa fotosintética, la concentración intercelular del CO₂ y azúcares, mientras que para conductancia estomática y transpiración fue mayor de los 60 a los 70 días, con poca influencia de los tratamientos. De los 60 días en adelante, no hubo diferencias entre tratamientos en el contenido de azúcares, y las clorofilas se mantuvieron constantes a lo largo del ciclo. Hubo inconsistencias con los fenoles, sin diferencias entre tratamientos a los 35-50 días, después de 1 h de la aplicación, incrementándose al final del ciclo al igual que el testigo sin exposición al gas. La tasa fotosintética fue la única variable que se vio favorecida por la mayor dosis del gas a lo largo del ciclo. Se concluye que la exposición de plantas de papa al CO₂ exógeno ejerció acciones diversas en las variables incluidas, sin proporción con la combinación dosis/tiempo.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, CO₂, Fotosíntesis.

ABSTRACT

CO₂ fixation is a key factor in photosynthesis. Considering the relatively low content of this gas in the atmosphere (0.03-0.04 %, 300-400 ppm), a large number of studies have been conducted to find out whether the exposure of potato plants to additional CO₂ may also bring additional growth benefits. The objective of this work was to quantify some physiological changes in potato plants, cv. Agata, exposed to different concentrations (700, 1,000, 1,200 ppm) and exposure times (5, 10, 15 min) of exogenous CO₂ once a week for five weeks throughout the growing cycle, under confinement. There were some reactions in the plants exposed to the gas relative to the controls in several variables, with higher influence of the dosage/exposure time factors one hour after the application. At 24 hr later, some of the treatments were diluted with a wider distribution of statistical similarities among them for photosynthesis. Similarly, plant age was a factor in the intensity of the reaction, with higher values at 35-50 days after planting (dap) for photosynthetic rate, intercellular CO₂ content, and sugars, while for stomatal conductance and transpiration the values were higher at 60-70 days, with little influence of the treatments. From 60 days on, there were no differences among treatments in sugar content, and chlorophyll remained constant throughout the cycle. Phenol contents were inconsistent, with no differences among treatments at 35-50 dap and one hour after the exposure, but increasing at the end of the cycle, same as the control with no exposure to the gas. Photosynthetic rate was the only variable favored by the highest gas dosage over the cycle. It is concluded that exposure of potato plants to exogenous CO₂ promoted diverse reactions in the variables studied, with no relationship to the dosage/exposure time combination.

Key words: *Solanum tuberosum*, CO₂, photosynthesis.

Introducción

El proceso de tuberización en papa (*Solanum tuberosum*) es influenciado por factores ambientales e intrínsecos; entre los que destacan el genotipo, la concentración interna de AG_3 , fotoperiodo, temperatura y radiación interceptada por la planta. Algunos de los factores que pueden ser manipulados para incrementar la producción de mini tubérculos en invernadero son: momento de inicio de fertilización, solución nutritiva y su composición, densidad de plantación, arreglo espacial de las plantas y diámetro mínimo de los tubérculos a ser cosechados (Struik y Wiersema, 1999) y actualmente existe evidencia que el uso de CO_2 exógeno provoca mayor rendimiento en la producción de tubérculos (Davidson y Xie, 2014).

En los últimos años el interés del productor se ha centrado en una serie de atributos de calidad en los tubérculos semilla de papa. Estos atributos son valorados según las características fisiológicas y fitosanitarias que permitan tener una producción segura y evitar la alta tasa de degeneración de la semilla en el campo, por lo que generalmente la semilla no se puede reproducir por más de 3 generaciones (Rubio *et al.*, 2006).

De acuerdo a Flores *et al.* (2009) la producción en invernadero de semilla básica de papa (*Solanum tuberosum*) se realiza con el propósito de obtener semilla libre de enfermedades, que muestre todo su potencial de producción en campo, tanto para semilla, como para la producción comercial de este tubérculo, por ello se requieren tubérculos mayores de 10 mm de diámetro que ya puedan ser cultivados en campo, aseguren la emergencia y mayor cantidad

de tallos por metro lineal para así lograr el establecimiento adecuado del cultivo y la mayor productividad del mismo.

Debido a lo anterior surge la necesidad de un sistema de producción de semillas que cubra las nuevas tendencias, tal es el caso del cultivo in vitro que se realiza exclusivamente por medio de la micro propagación siguiendo protocolos desarrollados en la década de los 80. (Rigato *et al.*, 2003), el uso de invernaderos que consiste en un sistema de aclimatación forzada con la finalidad de aumentar los rendimientos, procurando mantener las condiciones del invernadero (Rubio, 2000) y la aplicación de CO₂ exógeno que de acuerdo a estudios realizados por (Miglietta *et al.*, 1998; Schapendonk *et al.*, 2000; Lawson *et al.*,2001; Bunce,2004; Conn y Cochran, 2006; Fangmeier *et al.*, 2008a; Fleisher *et al*, 2008a) existe evidencia de un aumento de la producción de materia seca en tubérculos al incrementar la concentración de CO₂ ambiental.

En este contexto, el uso de CO₂ aplicado de manera exógena representa una técnica alternativa en el país y genera la necesidad de evaluar las respuestas bioquímicas y fisiológicas en papa a diferentes concentraciones y periodos de aplicación de CO₂.

El objetivo de este estudio estuvo enfocado a estudiar respuestas bioquímicas y fisiológicas, inducidas por aplicación exógena de dióxido de carbono (CO₂) en plantas de papa (*solanum tuberosum*).

Materiales y métodos

Localización, instalación y tratamientos

En un ciclo de cultivo de enero-mayo, 2016, y bajo condiciones de invernadero, en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Estado de México, México (19° 29' latitud Norte y 98° 53' longitud Oeste, a una a latitud de 2,245 msnm), se sembró un tubérculo-semilla var. Agata, por bolsa de plástico de 4 l, en una mezcla de turba de pantano, agrolita y suelo. Para la aplicación de CO₂ se establecieron cuatro plantas por cámara modificada de Kumari *et al.* (2015), con un tratamiento por cámara y un individuo por repetición. Dichas cámaras consistían en cajas de plástico de 40 x 60 cm de base y 30 cm de altura, con una entrada de CO₂ al centro del piso, que provenía de un depósito con CO₂ comercial con salida controlada.

Previo a la aplicación del gas, se cubría la cámara completa con una bolsa de plástico, conservándose así por 1 minuto en lo que se estabilizaba la concentración del interior de la caja (Figura. 1).

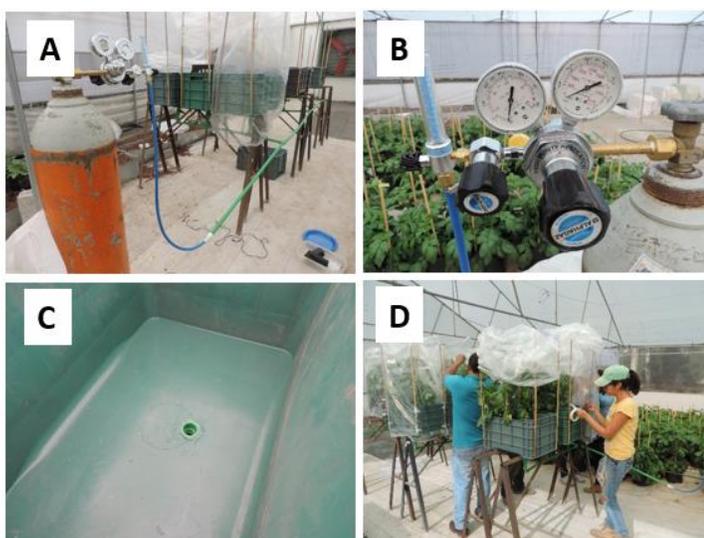


Figura 1. Instalación del ensayo. A, Tanque de CO₂ y conexión a las cámaras. B, de Reguladores del flujo. C, Orificio en la base de la cámara para la entrada del gas. D, Cubrimiento de la cámara previa la aplicación.

Con una distribución completamente al azar se instalaron los tratamientos de tres concentraciones de CO₂ y tres periodos de exposición cada una, más un testigo sin tratamiento, sumando un total de 10 tratamientos, con cuatro repeticiones (cuadro 1).

Cuadro 1. Nomenclatura para los tratamientos

Concentración de CO₂/700 ppm	Tiempo de exposición al CO₂/ minutos	Nomenclatura
700	5	C1T1
700	10	C1T2
700	15	C1T3
1000	5	C2T1
1000	10	C2T2
1000	15	C2T3
1200	5	C3T1
1200	10	C3T2
1200	15	C3T3
Testigo	Testigo	Testigo

Aplicaciones

A los 35 días después de la siembra se empezaron las aplicaciones de acuerdo a la dosis/tiempo del Cuadro 1, a las nueve de la mañana, repitiéndose el procedimiento posteriormente a los 50, 60, 70 y 80 dds.

Muestreo

Se tomaron mediciones fisiológicas y muestras de hojas a los a los mismos días de la aplicación y 24 horas después, para tener 5 muestreos. Cada muestreo consistió en la toma de 20 hojas sanas y maduras del dosel medio de la planta. Cada muestra se almacenó en bolsas de plástico selladas y transportaron en una hielera al laboratorio.

Mediciones fisiológicas

Tasa fotosintética, la conductancia estomática, tasa de transpiración y concentración interna de CO₂

En la superficie adaxial de hojas de la parte superior del dosel, totalmente expandidas (en la quinta hoja a partir del ápice) se midió la tasa fotosintética, la conductancia estomática, tasa de transpiración y concentración interna de CO₂ en 5 ocasiones a los 35, 50, 60, 70, 85 días después de la siembra; en días despejados y con suficiente luz solar para lo que se utilizará el sistema de fotosíntesis portátil (Modelo LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, Nebraska, EE.UU.). Las mediciones se realizaron el día de la exposición al CO₂ y un día después de la aplicación. Durante las mediciones, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) osciló entre 1000 y 1100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{S}^{-1}$. El sistema fue calibrado usando una fuente conocida de CO₂ y a la concentración ambiental.

Mediciones Bioquímicas

Contenido de azúcares totales

Los análisis se realizaron en material vegetal fresco obtenido de hojas de papa. La estimación de azúcares no reductores fue determinada por el método de antrona (Yemm & Willis, 1954) adaptado por Whitam *et al.*, 1971. Esta técnica es resultado del color verde que se produce cuando los carbohidratos se mezclan con antrona en solución ácida.

Este proceso consistió en la preparación previa del extracto que contendrá los azúcares totales; se procedió a pesar 1 gr de material vegetal previamente cortado en trozos pequeños, se colocó la muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, agregó 40 ml de etanol al 80 %, se hirvió de 20 a 30 minutos, se filtró y evaporó el etanol de la fase líquida obtenida previamente; esto se realizó en baño maría cuidando que no se caramelizara (Ortega y Rodríguez, 1979).

Con el extracto anterior se determinó el contenido de azúcares totales; esta etapa resultó de disolver el extracto anterior en 20 ml de agua destilada, se tomó 200 µl de muestra y se colocó en tubos de fondo plano que se ajustaron a un volumen de 3 ml con agua destilada; Con estas mezclas se procedió a la adición de 6 ml de antrona- ácido sulfúrico, cuidando de tener los tubos en baño de hielo al momento que se agregó la solución de antrona, evitando siempre que no ingresara agua al interior del tubo. Nuevamente se calentó en agua a ebullición la solución anterior, esto por 3 minutos; se retiró y puso en agua fría.

Con los extractos re suspendidos anteriormente se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific) a 600 nm. El blanco se preparó mezclando 3 ml de agua destilada con 6 ml de antrona- ácido el cual llevó el mismo procedimiento que las muestras.

Contenido de azúcares reductores.

El estudio se realizó con material vegetal fresco procedente de hojas de papa. La estimación de azúcares no reductores se determinó por el método de Nelson Somogy (Somogy, 1952). Este proceso consiste en la preparación previa del extracto por el método propuesto por Whitam *et al.*, 1971; Que se preparó pesando 1 gr de material vegetal previamente cortado en trozos pequeños, colocó la muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, agregó 40 ml de etanol al 80 %, hervir de 20 a 30 minutos, filtró y evaporó el etanol de la fase líquida obtenida previamente; esto se realizó en baño maría cuidando que no se caramelizara (Ortega y Rodríguez, 1979).

Con el extracto anterior se determinó el contenido de azúcares reductores; en esta fase se tomó 100 µl de la muestra ya re suspendida que se tenía para azúcares totales (Whitam *et al.*, 1971) y se colocó en un tubo de vidrio de fondo plano y se ajustó el volumen con agua destilada a 1 ml, añadió 1 ml de reactivo (A2 + B3) y agitó vigorosamente, se calentó a baño maría con agua a ebullición por un periodo de 20 minutos y se cubrió cada tubo con papel aluminio, pasado los 20 minutos se sacaron y pusieron en baño de hielo hasta enfriar.

A las muestras frías se le agregó 1 ml de arsenomolibdato más 7 ml de agua y se agitó vigorosamente.

Teniendo las muestras preparadas se utilizó un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific) y se obtuvo la absorbancia a 540 nm. El blanco para calibrar el equipo fue una mezcla de los reactivos anteriores, excluyendo la muestra.

Clorofila Total

La estimación de clorofila se realizó con un medidor SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development) en hojas maduras de papa (Lawson *et al.*, 2001) consistió en determinar la cantidad relativa de clorofila presente, midiendo la absorbancia de la hoja a dos longitudes de onda empleando el SPAD-502 (Minolta, Japón). Este instrumento mide la absorbancia de la hoja en las zonas roja e infrarroja. Utilizando estas dos absorbancias, el medidor calcula un valor numérico SPAD que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja.

Se han reportado este para un extenso número de investigaciones (Rodríguez *et al.* 1998; Fenech *et al.*, 2009), incluyendo las plantas de papa expuestas a elevadas concentraciones de CO₂ (Lawson *et al.* 2001).

Las determinaciones se realizarán insertando una hoja y cerrando el cabezal de medid, previamente calibrado.

Fenoles

La determinación se realizó mediante la metodología Folin-Ciocalteu reportada por Waterman y Mole (1994). Se agregaron 200 µl de cada extracto en tubos de fondo plano. Se agregaron 800 µl de agua destilada y se agitó. Se añadieron 7 ml de agua destilada y 500 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (2N), se dejaron reposar durante ocho minutos, se adicionó 1.5 ml de Carbonato de sodio (20 %), se mezcló y se dejó reposar por dos horas en completa oscuridad.

Concluidas las dos horas las muestras se leyeron a 760 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermoscientific, Waltham, Massachusetts).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 9.0), el cual consistió en ANAVA y comparaciones de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) por cada variable para la última fecha de muestreo, mientras que para conocer la relación entre variables se realizó un análisis de correlación general.

Resultados y discusión

Tasa fotosintética

Al medir la tasa fotosintética 1 y 24 horas después de la aplicación de CO₂, se observó cómo esta variable cambia en función de las horas transcurridas después de la aplicación de CO₂ (Fig. 1), presentando dicha variable valores similares a Kumari *et al.*, 2015.

Una hora después de la aplicación, los tratamientos C3T1, C3T2 y C3T3 mostraron una tendencia a incrementar la tasa fotosintética (Figura 1G, 1H y 1I), observándose que el periodo al que fueron sometidas sí influyó estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) siendo 10 minutos el periodo que logró la mejor tasa fotosintética (Figura 1H), a los 50 y 80 dds y 15 minutos (Figura 1I) a los 70 dds, resultando una tendencia similar a los datos obtenidos 24 horas después de la aplicación (Figura 1).

Los resultados obtenidos una hora después de la aplicación muestran como las mejores tasas fotosintéticas se dan a 1200 ppm, sin embargo las de 1000 ppm a los 35, 50, 60 y 80 días comparten estadísticamente similitud, así que por cuestiones económicas y prácticas podría usarse la concentración de 1000

ppm, tal como reporta (Kaminski *et al.*, 2014), el cual encontró que el CO₂ elevado estimuló la tasa de fotosíntesis en un 40%.

Si se comparan las mediciones realizadas 24 horas después de la aplicación con las mediciones realizadas 1 hora después (Figura 1), se observa un aumento de las tasas fotosintéticas a los 35 y 50 dds y una disminución a los 60 dds para volver a incrementar a los 70 y 80 ppm pero con tasas fotosintéticas menores a los 35 y 50 dds, La tasa fotosintética tiende a cambiar de acuerdo a la etapa fenológica de la planta(Salisbury & Ross,1994), uno de los factores que afectan la tasa fotosintética es la edad de la hoja, mientras que (Katny *et al.*, 2005) mencionan que la disminución de la capacidad fotosintética en CO₂ elevado se debe a una reducción del contenido de nitrógeno y proteína en las hojas.

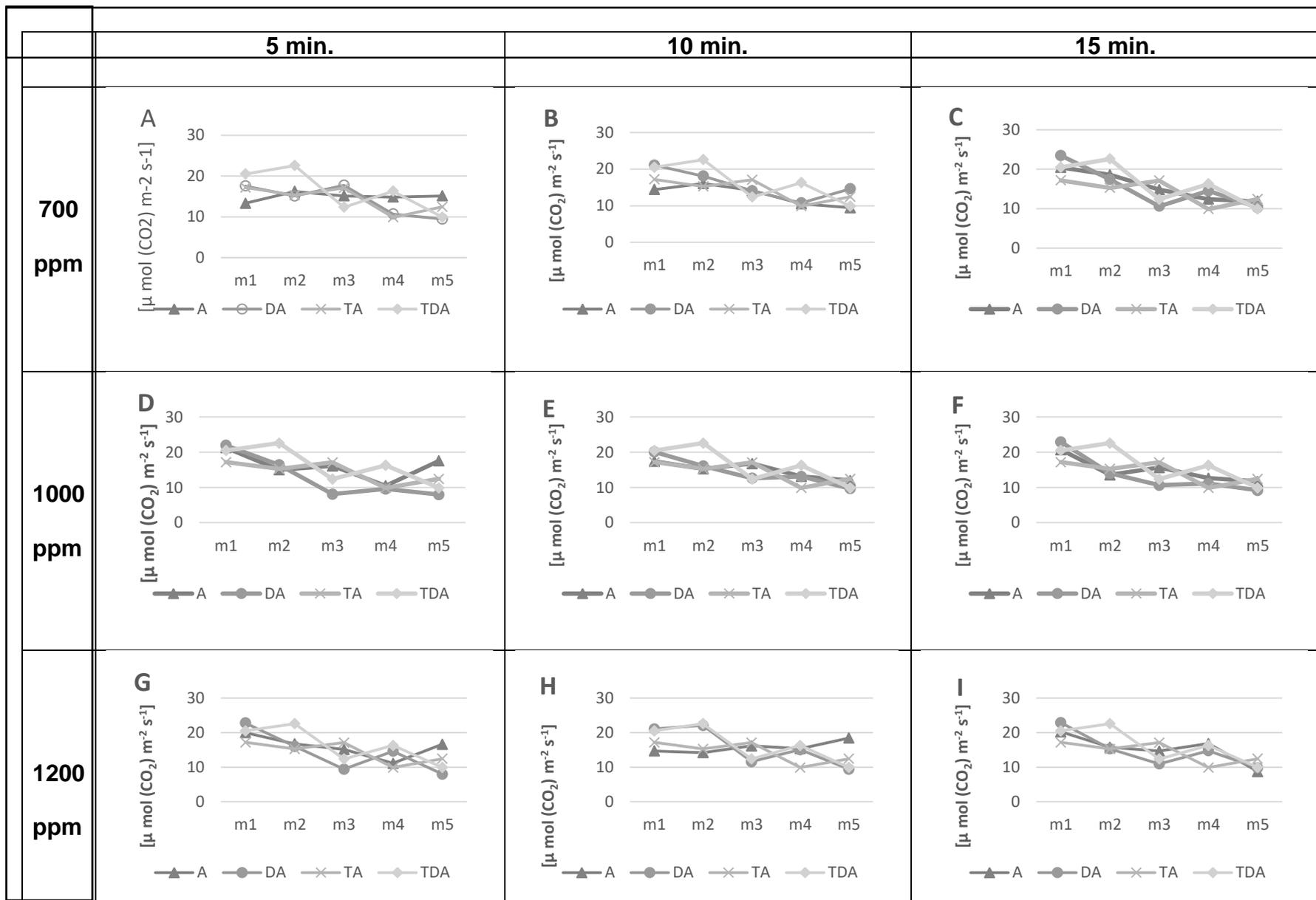


Figura 1. Tasa fotosintética

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación × Testigo 1 h después de la aplicación ◆ Testigo 24 h después

Conductancia Estomática

En general, la conductancia de los estomas disminuyó al aumentar la concentración de CO₂ (Figura 2), tal como lo reporta (Long *et al.*, 2004) donde señala que junto con el aumento de la fotosíntesis, el aumento de la concentración con CO₂ provoca un cierre de los estomas. Sin embargo, no se conoce todavía el mecanismo por el que los estomas perciben el CO₂ y donde se percibe en la hoja. La tendencia anterior fue estadísticamente similar (Tukey, $P \leq 0.05$) en los datos obtenidos 1 y 24 horas después de la aplicación de CO₂, a los 50, 60, 70 y 80 dds. Este comportamiento puede estar ligado, en parte, a algún tipo de estrategia para evitar la pérdida de agua (Reyes *et al.*, 2010).

La respuesta de conductancia estomática por efecto de los tratamientos, deja ver que esta variable tiene una tendencia a ser igual en todos, durante la primera evaluación (35 dds) la cual estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) no tiene cambios respecto al testigo. No obstante este comportamiento, no continuó en las siguientes determinaciones (50, 60, 70 y 80 dds). Lo anterior puede estar asociado a lo reportado por (Nieto, 2008) que señala como conductancia estomática tiene dependencia de la temperatura ambiental y considerando que la temperatura fluctuó por las condiciones propias del experimento esto podría explicar por qué no hubo diferencias estadísticas significativas, así mismo (Nieto, 2008), señala que generalmente conductancia estomática responde a los cambios de CO₂ con mayor lentitud que la fotosíntesis, mismo resultado que coincide con este estudio (figura f2).

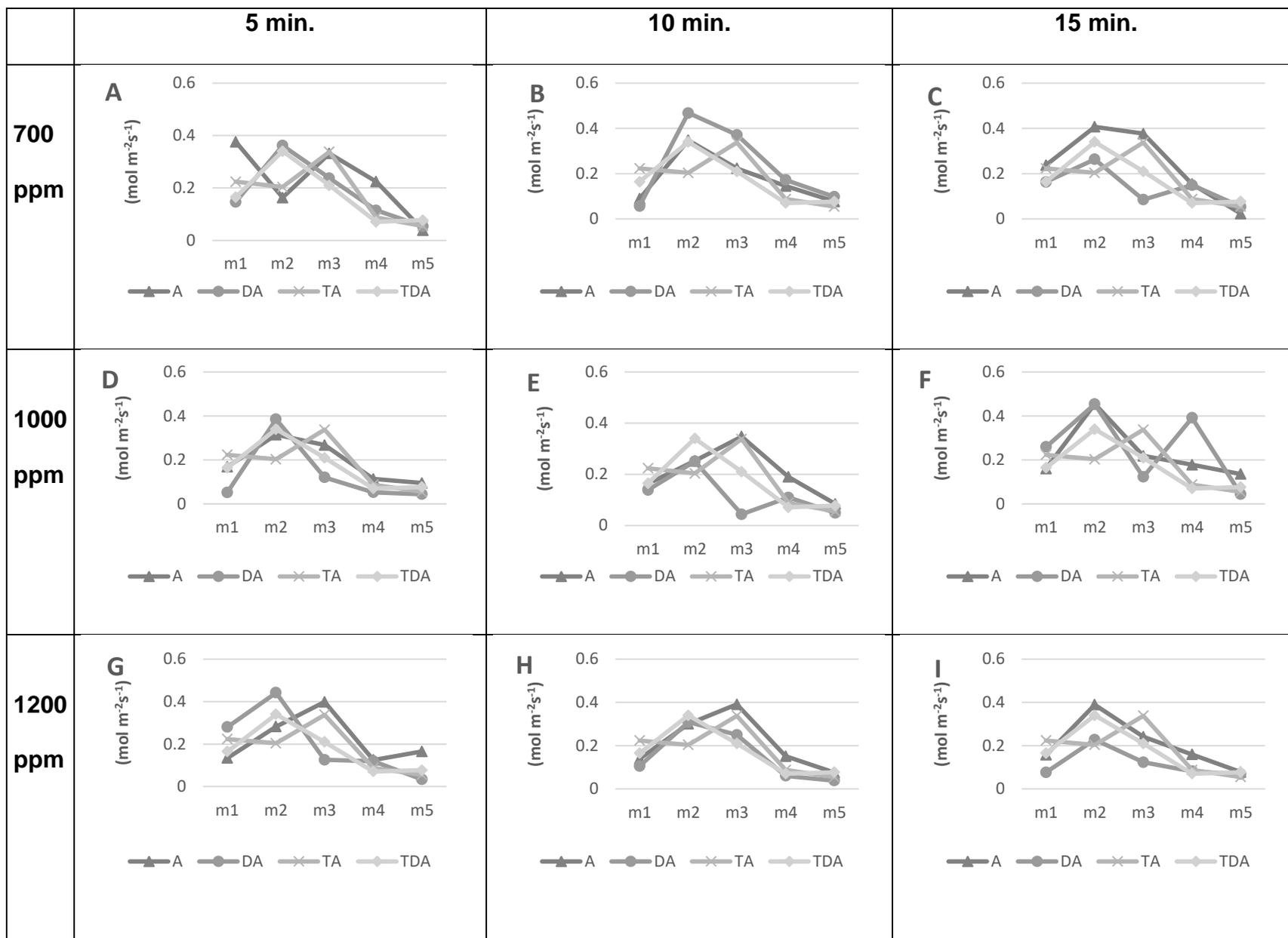


Figura 2. Conductancia estomática

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación × Testigo 1 hora después de la aplicación ◆ Testigo 24 h después

Tasa de transpiración

La tasa de transpiración fue mayor en los tratamientos C1T3, C3T2 y CIT1(Figura 3A, 3G y 3H) con respecto al testigo en las mediciones realizadas una hora después a los 50,60 y 70 dds respectivamente y no presentó cambios con respecto al testigo a los 35 y 80 dds., se presentó un evidente influencia de la edad de planta sobre los resultados y se observa como a mayor concentración de CO₂ independientemente del periodo de exposición la tasa de transpiración disminuía debido a que la velocidad de transpiración aumento con dosis elevadas de CO₂ (Kumari,2015),esto se puede atribuir a que el cierre estomático parcial reduce la tasa de transpiración (Sandvik *et al.*, 1987; Larcher 2003), lo cual coincide con lo reportado en la figura 3.En el caso de las mediciones después de 24 horas, la tasa de transpiración fue mayor con respecto al testigo en los tratamientos C1T2 a los 50 y 60 dds y presentó la tasa de transpiración más alta en los testigos en las mediciones realizadas a los 35 y 80 dds.

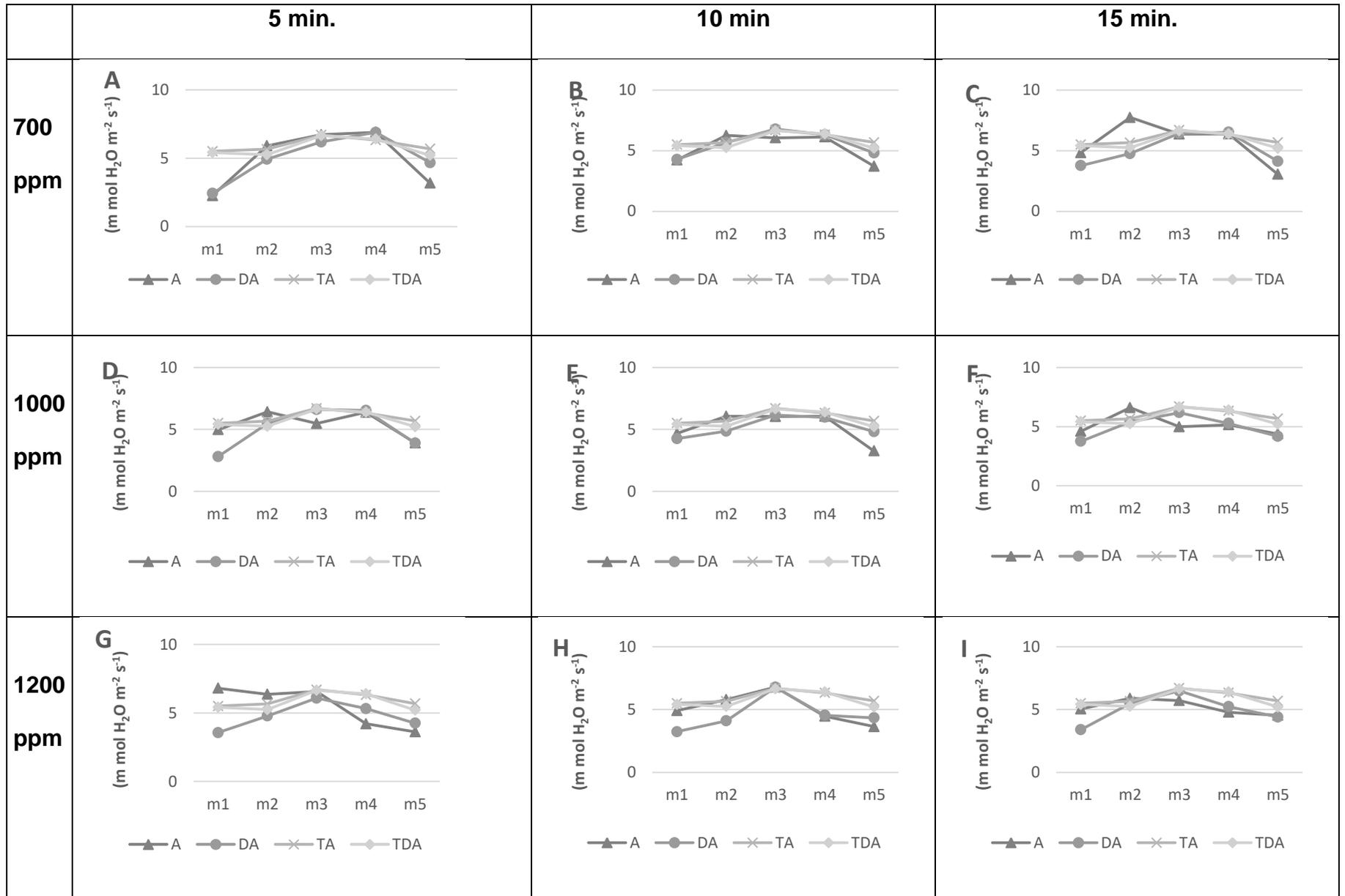


Figura 3. Tasa de transpiración.

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación * Testigo 1 hora después de la aplicación ◆ Testigo 24 h después

Concentración intercelular de CO₂

La concentración intercelular bajo los diferentes periodos de exposición y dosis de CO₂, presentó cambios estadísticamente significativo (Tukey, $P \leq 0.05$) en comparación con el testigo, de tal forma que los tratamientos que presentaron una concentración intercelular más elevada fue en C1T2 (Figura 4B) a los 35 y 60 dds; y C2T3 y testigo (Figura 4F) en los muestreos realizados a los 50 y 70 dds respectivamente mismos que fueron iguales cuando se midió 1 y 24 horas después, observándose que solo a los 80 dds el comportamiento fue diferente, siendo el tratamiento C2T1 el mejor en la medición realiza una hora después y el C2T3 a las 24 horas después, compartiendo en ambos casos la dosis de CO₂ pero a diferente periodo de exposición.

En cuanto a los cambios en la concentración intercelular medida en los diversos tratamientos una hora después con respecto a las 24 horas (Figura 4), se observa como tiene una tendencia a subir al igual que en el caso de la tasa fotosintética. Los cambios en la fotosíntesis neta en respuesta a los tratamientos con bajo, medio y alto CO₂ fueron proporcionales a los aumentos de CO₂ intercelular (Sicher & Bunce, 1999).

En general se observa como estadísticamente existe diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.05$) en cuanto a los factores (periodos de exposición y las concentraciones de CO₂) en sus tres niveles; lo cual muestra como la concentración intercelular al igual que la tasa fotosintética está influenciada por estos factores; esto se relaciona con lo mencionado por Mott, 1988 y Onandia *et al.*, 2011 que señalan como los estomas responden al CO₂ intercelular, no al

externo, lo que explica la notable constancia de la relación entre CO_2 intercelular y externo.

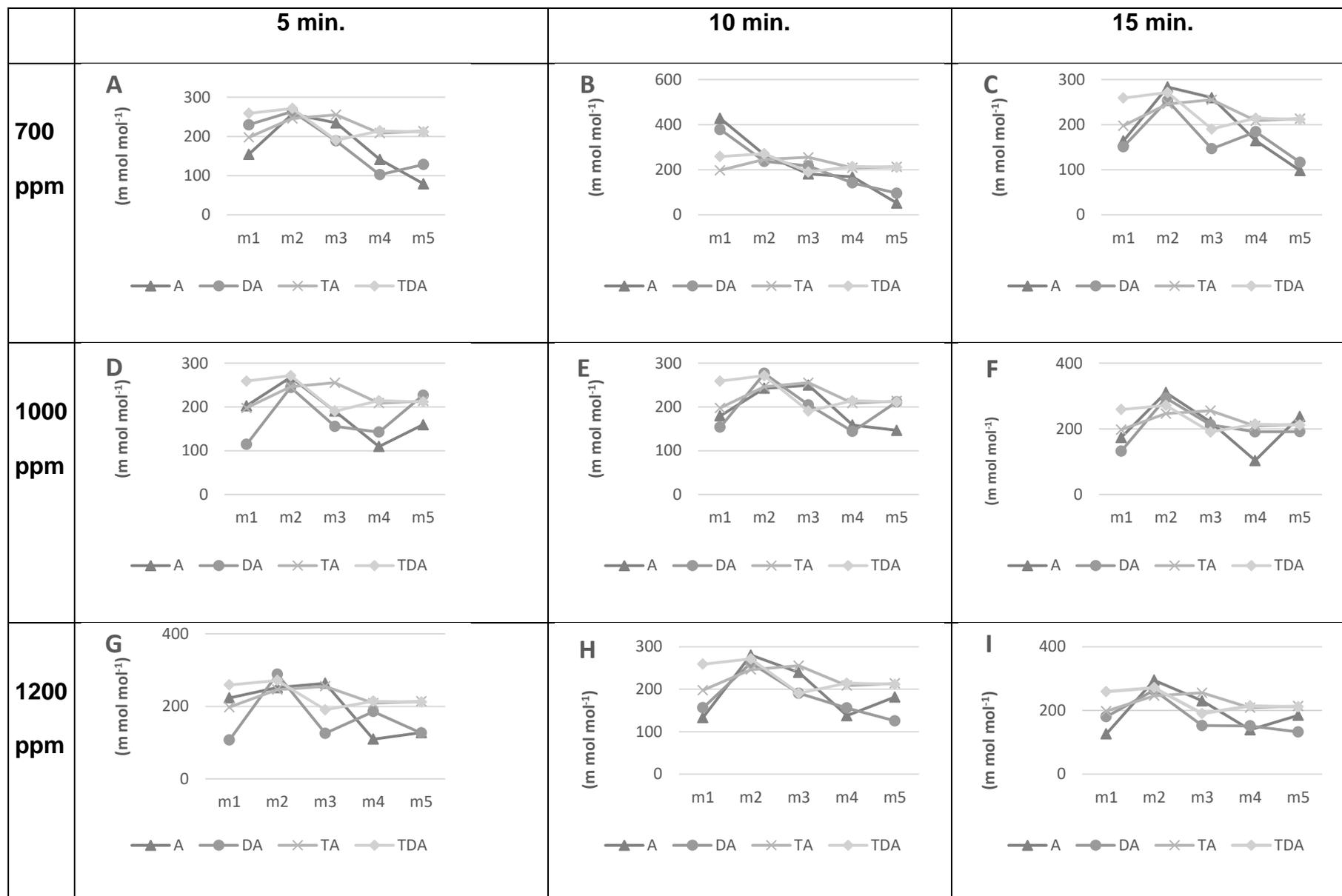


Figura 4. Concentración intercelular

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación × Testigo 1 hora después de la aplicación ◆ Testigo 24 h después

Azúcares totales y reductores

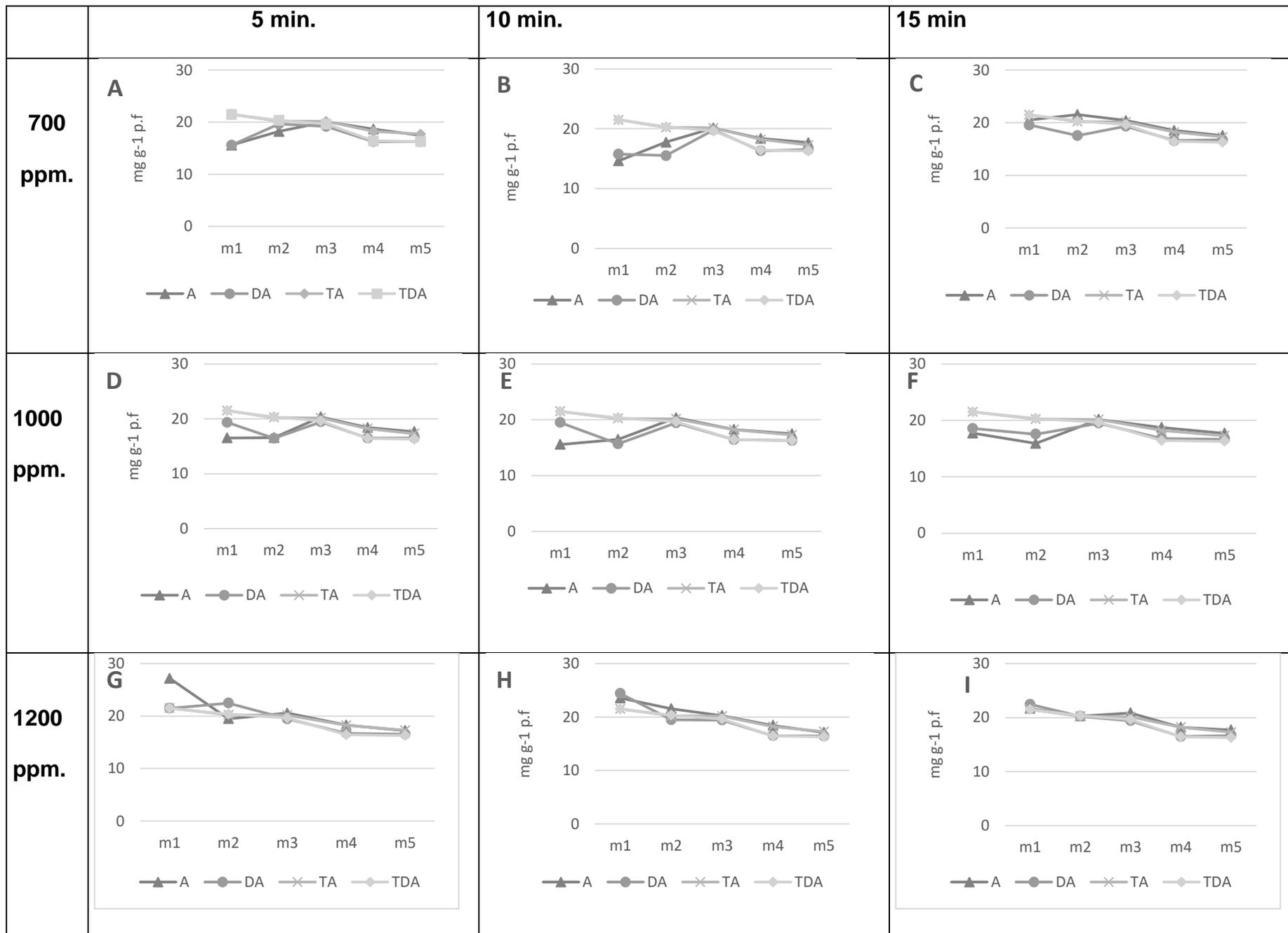
En las hojas de los diferentes tratamientos, las que se encontraban en las etapas finales del desarrollo (60,70 y 80 dds) no mostraron una respuesta a la concentración elevada (700,1000 y 1200 ppm) de CO₂ para los azúcares totales. Sólo las hojas más jóvenes (35 y 50 dds) mostraron una respuesta al CO₂, mismo comportamiento siguieron las que se midieron 24 horas después de la aplicación, el contenido de azúcares totales había aumentado en las hojas de edad joven y media (35 y 50 dds), respectivamente, pero después de 1 día el efecto no persistió en las hojas jóvenes (figura 5).

El aumento en la concentración de CO₂ dio lugar a un incremento temporal del nivel de azúcares totales en las hojas más jóvenes, que se mantuvo durante al menos 1 día (Figura 5). Como reportan (Katny *et al.*, 2005), el contenido de azúcares es notablemente más alto en hojas bajo CO₂ elevado. La formación de biomasa se mejora inicialmente en los primeros días de exposición, pero este crecimiento no se mantiene durante largo tiempo debido a que se presenta un fenómeno llamado aclimatación (Lemoine *et al.*, 2013 & Katny, *et al.*, 2005).

En este estudio se puede observar (figura 5) como a medida que avanza la edad de las plantas la concentración de azúcares totales disminuye con respecto a las primera etapas, lo cual puede estar relacionado con que reporta (Salisbury & Ross, 1994) que la acumulación de carbohidratos resultante en las hojas, disminuye, debido a un decremento de la tasa fotosintética que está asociada a formación de RUBISCO, quien influye directamente en el proceso de aclimatación (Nieto, 2008).

En el caso de los azúcares reductores, se muestra como una hora después de la exposición a CO₂ elevado, los niveles habían aumentado marcadamente sólo en hojas jóvenes y el contenido en las diferentes etapas de desarrollo fue diferente.

En estudios de exposición de plantas a periodos cortos, las respuestas foliares a CO₂ elevado pueden ser totalmente diferentes. En contraste con el estudio de Sicher y Bunce (2001), en este experimentos el CO₂ elevado afectó considerablemente el contenido de azúcares reductores en hojas de papa después de 1 día (Figura 6). En coincidencia con nuestras observaciones, los azúcares reductores disminuyeron después de 1 y 2 días, respectivamente; en *Gossypium hirsutum* (Farrar y Williams, 1991) y *Plantago major* (Fonseca y Stulen, 2000) tras un cambio periódico en la concentración de CO₂. Aparentemente, la respuesta del nivel de azúcares al cambio de CO₂ depende fuertemente de las especies de plantas y la etapa de desarrollo así mismo el protocolo que se siguió en la determinación de los compuestos, ya que en el caso de los azúcares reductores al igual que en los totales, los valores son cercanos a los reportados (Katny *et al.*, 2005), y se puede atribuir que existe diferencia debido a la técnica usada.



	5 min.	10 min.	15 min.
--	---------------	----------------	----------------

Figura 5. Azucares totales

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación ✕ Testigo 1 hora después de la aplicación ◆ Testigo 24 h después

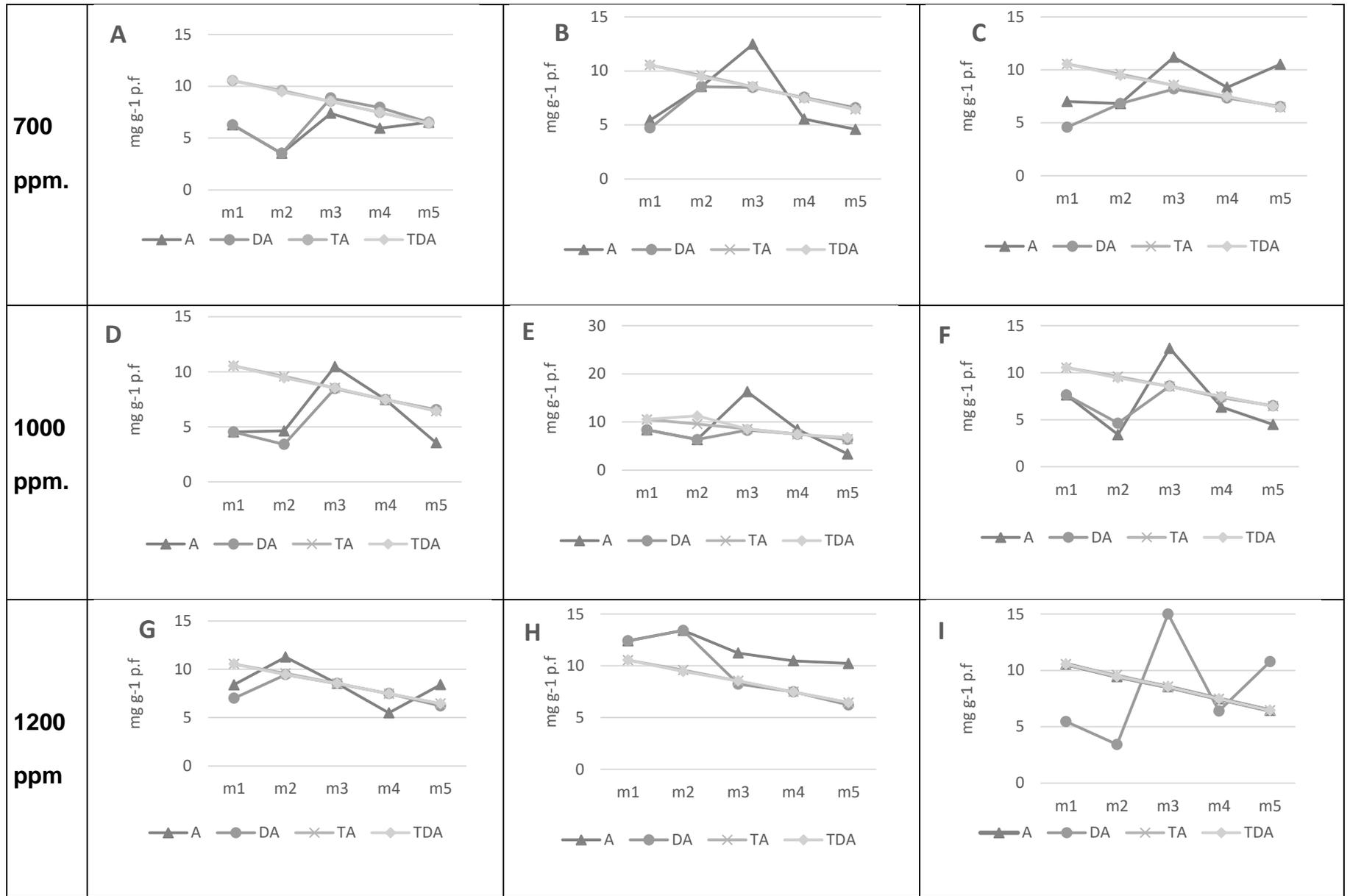


Figura 6. Azúcares reductores.

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación ✖ Testigo 1 hora después de la aplicación ● Testigo 24 h después

Clorofila

El contenido relativo de clorofila en las hojas no presentó cambio estadísticamente significativo ($Tukey \leq 0.05$) por efecto del periodo de exposición y dosis de CO_2 , pero disminuyó gradualmente través de las diferentes mediciones (35, 50, 60, 70 y 80 dds) tal como se observa en la Figura 7, mismo comportamiento reporta (Nieto, 2008 & Martínez *et al.*, 2012). La tendencia anterior se observó tanto en los datos registrados 1 y 24 horas después de la exposición a CO_2 ; Se sugiere de acuerdo a lo reportado por Katny *et al.*, 2005 que para tener una respuesta estadísticamente significativa, los tratamientos tuvieron que haber estado sometidos a periodos de exposición a CO_2 prolongados, ya que la cantidad total de elementos nutritivos absorbidos por los cultivos de papa aumenta cuando se exponen a dosis elevadas y periodos prolongados; asumiendo que el nitrógeno es un elemento que forma parte de la estructura de la clorofila, si este es limitado también la cantidad de la misma lo será.

Los valores en los diferentes tratamientos fueron superiores a los reportados por discusión clorofila; que reporta 42 y 51.8 unidades SPDA durante las primeras etapas de desarrollo.

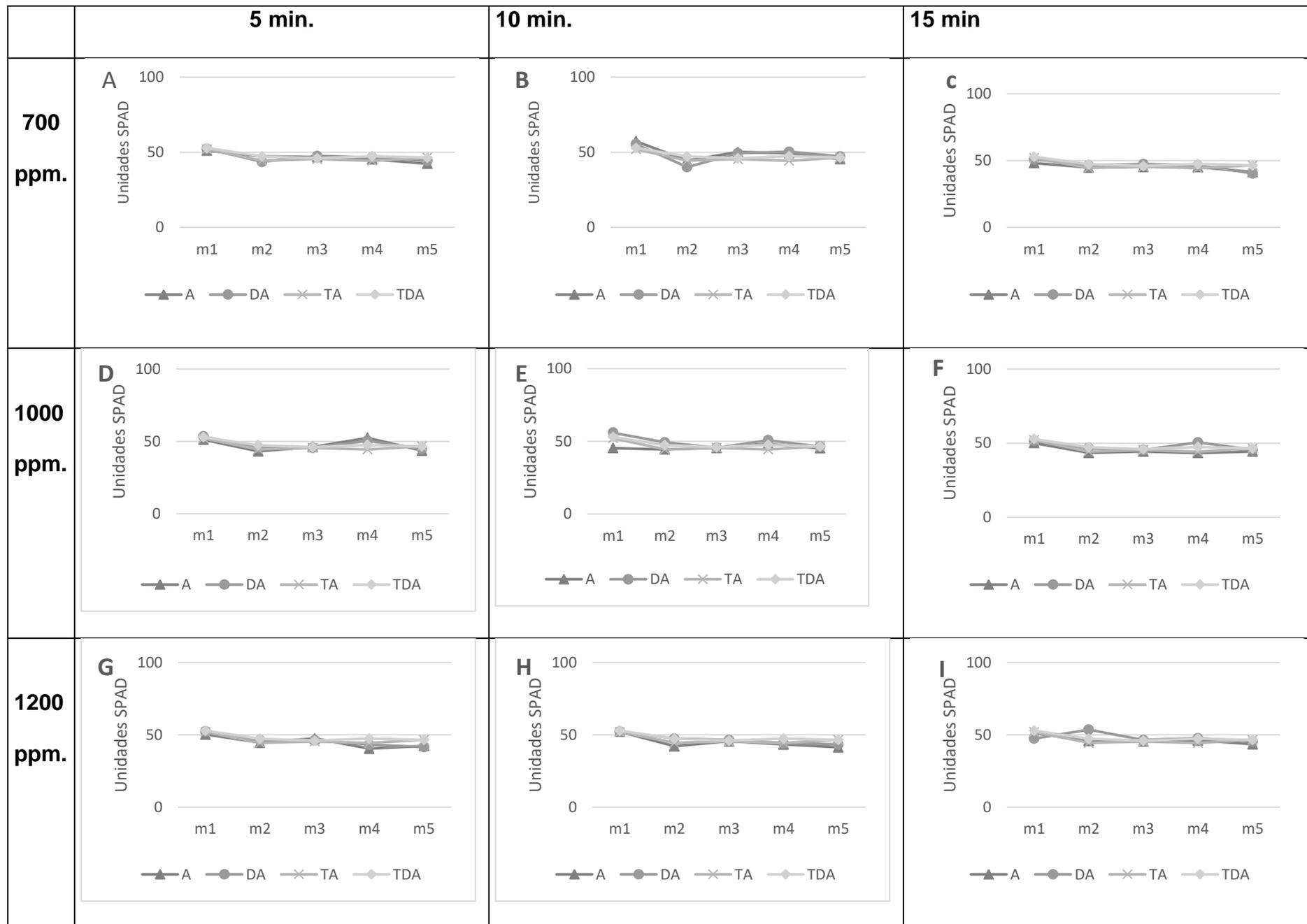


Figura 7. Clorofila Total

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación ✕ Testigo 1 hora después de la aplicación ◆ Testigo 24 h después

Fenoles

El contenido de fenoles fue mayor que el testigo a los 35,60 y 70 dds en el tratamiento C3T1,C1T3 y C3T1 respectivamente, esto en la mediciones realizadas 1 hora después de exponer las plantas al CO₂; en contraste, en las determinaciones realizadas 24 horas después a los 35 y 50 dds no hubo incremento con respecto al testigo y solo presentándose un incremento con respecto al mismo en los tratamientos C2T2 y C3T1; en el muestreo realizado a los 60 y 70 dds no se mostró diferencia significativa con respecto al testigo en los tratamientos C1T1,C2T2 y C3T2 en la última medición (80 dds). Las variaciones en el contenido de fenoles fue altamente significativas por efecto las interacciones de sus factores

El contenido de proteína y la síntesis de fenoles están relacionadas debido a la competencia por la fenilalanina, un precursor limitante de la velocidad de síntesis de fenilpropanoides, así como aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas según el modelo de competencia proteica (Jones y Hartley, 1999). Dicho modelo explica ampliamente las observaciones mostradas en todos los tratamientos durante el estudio realizado, en el cual se observa como la edad de la planta influye en el contenido de fenoles lo que coincide con estudios previos, los cuales señalan como el contenido de proteína en las hojas está asociado con la edad de la planta. En otro estudios se mostró como la biosíntesis fenólica en plantas sometidas a estrés por CO₂ elevado provocó una la disminución de en el contenido de proteína.

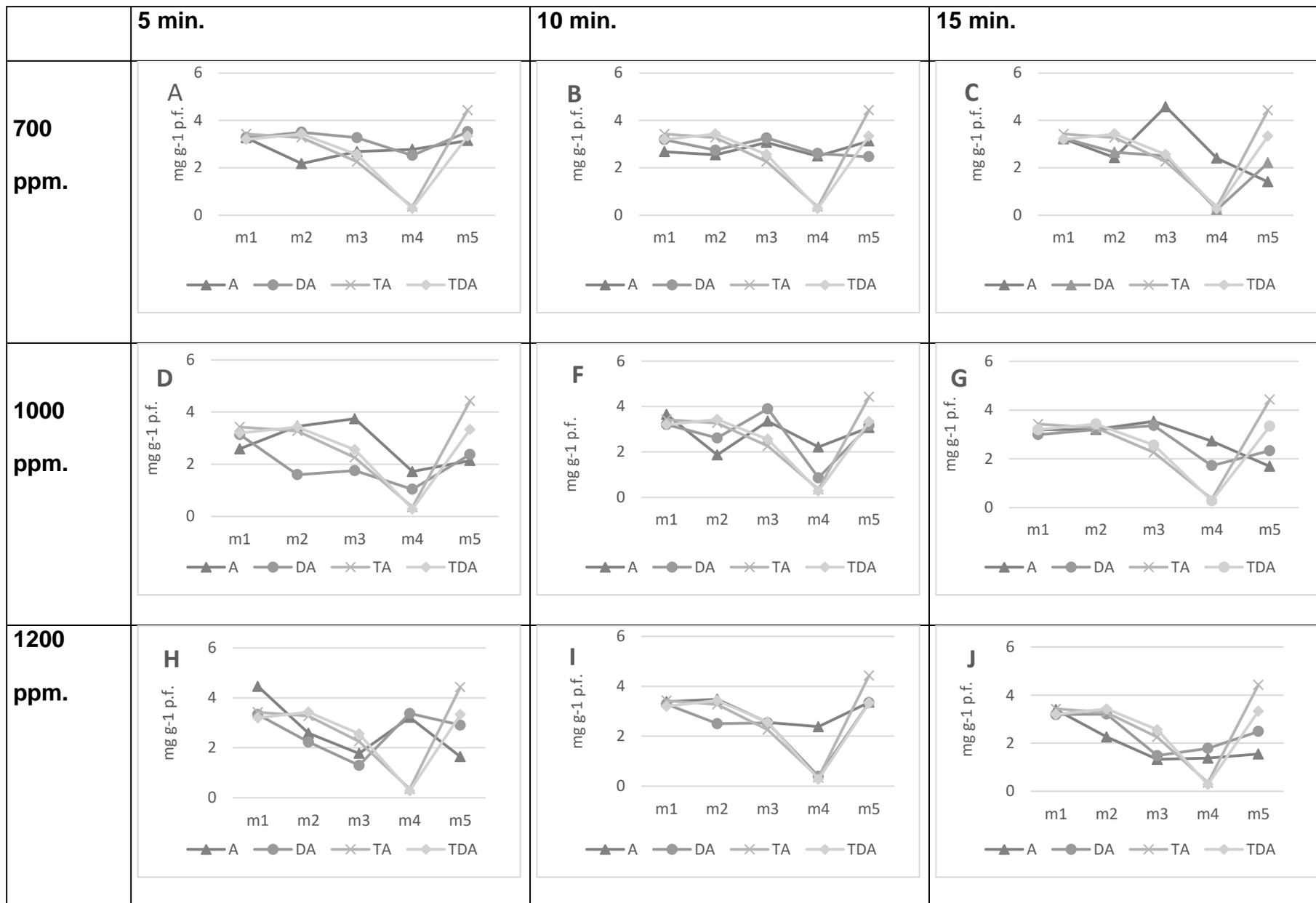


Figura 8. Contenido de fenoles totales.

▲ 1 hora después de la aplicación ● 24 h después de la aplicación × Testigo 1 hora después de la aplicación ◆ Testigo 24 h después

Conclusiones

La exposición a concentraciones superiores a la ambiental de CO₂ estimuló diferencialmente las respuestas en variables bioquímicas y fisiológicas en plantas de papa, sin proporción con la combinación dosis/tiempo o etapas fenológicas.

Bibliografía

- Conn, J. S., & Cochran, V. L. (2006). Response of potato (*Solanum tuberosum* L.) to elevated atmospheric CO₂ in the North American Subarctic. *Agriculture, ecosystems & environment*, 112(1), 49-57.
- Davidson, R.D.; Xie, K.Y. 2014. Seed potato production. In: Navarre, R.; Pavek, M.J. (Eds.). The potato: Botany, production and uses. Wallingford (UK). *CAB International*. ISBN 9781780642802. pp. 115-132.
- Fangmeier, A., De Temmerman, L., Black, C., Persson, K., & Vorne, V. (2002). Effects of elevated CO₂ and/or ozone on nutrient concentrations and nutrient uptake of potatoes. *European Journal of Agronomy*, 17(4), 353-368.
- Farrar, J. F., & Williams, M. L. (1991). The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant, Cell & Environment*, 14(8), 819-830.
- Fenech-Larios, L., Troyo-Diéguez, E., Trasviña-Castro, M., Ruiz-Espinoza, F., Beltrán-Morales, A., Murillo-Amador, B., & Zamora-Salgado, S. (2009). Relación entre un método no destructivo y uno de extracción destructivo, para medir el contenido de clorofila en hojas de plántula de albahaca (*Ocimum basilicum* L). *Universidad y ciencia*, 25(1), 99-102.

- Fleisher, D. H., Timlin, D. J., & Reddy, V. R. (2008). Elevated carbon dioxide and water stress effects on potato canopy gas exchange, water use, and productivity. *Agricultural and forest meteorology*, 148(6), 1109-1122.
- Flores-López, R., Sánchez-del Castillo, F., Rodríguez-Pérez, J. E., Mora-Aguilar, R., Colinas-León, M. T., & Lozoya-Saldaña, H. (2009). Influencia de la radiación solar en la producción de semilla-tubérculo de papa bajo cultivo sin suelo. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(1), 25-30.
- Fonseca, F., & Stulen, I. (2000). Effect of a Switch from Elevated to Ambient CO₂ on Growth and Carbohydrate Allocation of *Plantago major* ssp. *pleiosperma*. *PHYTON-HORN*, 40(3), 45-50.
- Jones, C. G., & Hartley, S. E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos*, 27-44.
- Kaminski, K. P., Kørup, K., Nielsen, K. L., Liu, F., Topbjerg, H. B., Kirk, H. G., & Andersen, M. N. (2014). Gas-exchange, water use efficiency and yield responses of elite potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars to changes in atmospheric carbon dioxide concentration, temperature and relative humidity. *Agricultural and Forest Meteorology*, 187, 36-45.
- Katny, M. A. C., Hoffmann-Thoma, G., Schrier, A. A., Fangmeier, A., Jäger, H. J., & van Bel, A. J. (2005). Increase of photosynthesis and starch in potato under elevated CO₂ is dependent on leaf age. *Journal of plant physiology*, 162(4), 429-438.
- Kumari, S., Agrawal, M., & Singh, A. (2015). Effects of ambient and elevated CO₂ and ozone on physiological characteristics, antioxidative defense system and metabolites of potato in relation to ozone flux. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 276-287.
- Larcher, W. (2003). *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media (2), 110-128

- Lawson, T., Craigon, J., Tulloch, A. M., Black, C. R., Colls, J. J., & Landon, G. (2001). Photosynthetic responses to elevated CO₂ and O₃ in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Physiology*, 158(3), 309-323.
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N. & Faucher, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4, 272.
- Long, S. P., Ainsworth, E. A., Rogers, A., & Ort, D. R. (2004). Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 591-628.
- Martínez, J. P., Giletto, C. M., & Echeverría, H. E. (2012). Nitrato en pecíolo e índice verde en estratos del canopeo del cultivo de papa. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 38(2), 141-149.
- Miglietta, F., Magliulo, V., Bindi, M., Cerio, L., Vaccari, F. P., Loduca, V., & Peressotti, A. (1998). Free air CO₂ enrichment of potato (*Solanum tuberosum* L.): development, growth and yield. *Global Change Biology*, 4(2), 163-172.
- Mott, K. A. (1988). Do stomata respond to CO₂ concentrations other than intercellular. *Plant Physiology*, 86(1), 200-203.
- Nieto, A. (2008). Mecanismos de aclimatación de la asimilación fotosintética de carbono a los aumentos de CO₂ y temperatura del aire en el trigo. 61-131 pp.
- Onandia, G., Olsson, A. K., Barth, S., King, J. S., & Uddling, J. (2011). Exposure to moderate concentrations of tropospheric ozone impairs tree stomatal response to carbon dioxide. *Environmental Pollution*, 159(10), 2350-2354.
- Ortega Delgado, M. L., & Rodríguez Coquiez, C. (1979). Estudio de carbohidratos en variedades Mexicanas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. y *Phaseolus coccineus* L.). *Agrociencia*. 32(3), 167-176.

- Reyes, F. S., Ávila, J. A., Murrieta, Á. L., Calzada, R. T., Arriaga, O. E., & Herrera, G. G. (2010). Efecto de niveles de NaCl sobre fotosíntesis y conductancia estomática en nogal pecanero (*Carya illinoensis* (Wangeh.) K. Koch). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 9(2), 135-141.
- Rigato, S., Gonzalez, A., & Huarte, M. (2003) Analítico: Producción de plantulas de papa a partir de técnicas combinadas de micropropagación e hidroponía para la obtención de semilla prebasica. *Revista Latinoamericana de la Papa.* , 12(1), 110-120.
- Rubio Covarrubias, O. Á., León, A., Humberto, I., Ireta Moreno, J., Sánchez Salas, J. A., Fernández Sosa, R., & Cadena Hinojosa, M. A. (2006). Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc. En las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura técnica en México*, 32(2), 201-211.
- Rubio, C. O. 2000. Manual para la producción de papa en las Sierras y Valles Altos del Centro de México. SAGAR. INIFAP. CIRCE. Campo Exp. Valle de Toluca. Libro Técnico No. 1. Zinacantepec, México. 80pp
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W., (1994). In fijación de dióxido de carbono y síntesis de carbohidratos (Eds.) *Fisiología vegetal* (1ª Ed., pp. 249-273). México DF: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Sandvik, A. K., Waldum, H. L., Kleveland, P. M., & Søgne, B. S. (1987). Gastrin produces an immediate and dose-dependent histamine release preceding acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 22(7), 803-808.
- Schapendonk, A. H., van Oijen, M., Dijkstra, P., Pot, C. S., Jordi, W. J., & Stoop, G. M. (2000). Effects of elevated CO₂ concentration on photosynthetic acclimation and

- productivity of two potato cultivars grown in open-top chambers. *Functional Plant Biology*, 27(12), 1119-1130.
- Sicher, R. C., & Bunce, J. A. (1999). Photosynthetic enhancement and conductance to water vapor of field-grown *Solanum tuberosum* in response to CO₂ enrichment. *Photosynthesis Research*, 62(2), 155-163.
- Sicher, R. C., & Bunce, J. A. (2001). Adjustments of net photosynthesis in *Solanum tuberosum* in response to reciprocal changes in ambient and elevated growth CO₂ partial pressures. *Physiologia Plantarum*, 112(1), 55-61.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 195, 19-23.
- Struik, P. C., & Wiersema, S. G. (1999). Seed potato technology. Production of pre-basic seed. Struik, P. C., & Wiersema, S. G.(Eds.) Wageningen Academic(pp. 175- 206).
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific.28(6), 320.
- Witham, F. H., Blaydes, D. F., & Devlin, R. M. (1971). Experiments in plant physiology, 10(6), 429-433.
- Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, 57(3), 508.

APENDICES

Apéndice 1. Apéndice 1 Comparación de medias

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂								Cuadro 1. Co	
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
Comparación de medias para Tasa de Fotosíntesis (FOT).												
700 ppm	5 minutos	C1T1	13.302	E ^z	15.136	BC	15.134	CDE	14.839	B	15.136	BC
	10 minutos	C1T2	14.422	DE	9.4429	DE	14.124	E	10.536	DE	9.4429	DE
	15 minutos	C1T3	20.441	AB	11.876	D	14.821	DE	12.404	C	11.876	D
1000 ppm	5 minutos	C2T1	20.22	AB	17.539	AB	16.104	BC	10.464	DE	17.539	AB
	10 minutos	C2T2	17.415	C	11.99	D	16.776	AB	13.152	C	11.99	D
	15 minutos	C2T3	20.729	AB	11.717	DE	15.646	CD	12.63	C	11.717	DE
1200 ppm	5 minutos	C3T1	20	B	16.612	AB	15.128	CDE	11.106	D	16.612	AB
	10 minutos	C3T2	14.699	D	18.415	A	16.163	BC	15.359	B	18.415	A
	15 minutos	C3T3	21.278	A	8.7184	E	14.646	DE	16.814	A	8.7184	E
Testigo			17.175	C	12.441	CD	17.372	A	9.8815	E	12.441	CD
DMSH			1.1289		1.1357		1.0768		0.7696		3.1091	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	17.54	D ^z	15.094	DE	11.735	BCD	10.695	D	9.4301	B
	10 minutos	C1T2	21.071	ABC	18.08	B	14.085	A	10.768	D	9.784	B
	15 minutos	C1T3	21.042	ABC	17.409	BC	10.611	E	14.522	BC	10.289	B
1000 ppm	5 minutos	C2T1	21.977	ABC	16.407	CD	8.1047	G	9.582	D	7.9671	C
	10 minutos	C2T2	20.107	C	16.092	CD	12.62	B	13.124	C	9.666	B
	15 minutos	C2T3	22.928	AB	13.996	E	10.639	E	11.122	D	9.1574	B
1200 ppm	5 minutos	C3T1	22.776	AB	16.013	CD	9.4106	F	14.622	BC	7.9796	C
	10 minutos	C3T2	23.459	A	22.053	A	11.592	CD	15.07	AB	9.4211	B
	15 minutos	C3T3	22.878	AB	15.291	DE	10.956	DE	14.757	AB	14.613	A
Testigo			20.495	BC	22.585	A	12.358	BC	16.274	A	9.9039	B
DMSH			2.5032		1.6266		0.9405		1.5629		3.1091	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 2. Comparación de medias para conductancia estomática (COND).

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂										BCD	
			Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂					Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂						
CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds	90 dds	100 dds	110 dds	120 dds	130 dds	140 dds	150 dds
700 ppm	5 minutos	C1T1	0.1468 A ²	0.0387 D	0.3315 B	0.2245 A	0.0387 D							
	10 minutos	C1T2	0.0573 A	0.0777 BC	0.2237 C	0.1457 BCD	0.0777 BC							
	15 minutos	C1T3	0.1634 A	0.0235 D	0.3767 AB	0.1545 BCD	0.0235 D							
1000 ppm	5 minutos	C2T1	0.0528 A	0.0952 B	0.2682 C	0.1139 DE	0.0952 B							
	10 minutos	C2T2	0.1383 A	0.0842 BC	0.3478 AB	0.1897 AB	0.0842 BC							
	15 minutos	C2T3	0.2598 A	0.1364 A	0.219 C	0.1784 ABC	0.1364 A							
1200 ppm	5 minutos	C3T1	0.28 A	0.1651 A	0.3982 A	0.1253 CDE	0.1651 A							
	10 minutos	C3T2	0.1056 A	0.0757 BC	0.3907 A	0.1513 BCD	0.0757 BC							
	15 minutos	C3T3	0.0767 A	0.0779 BC	0.2413 C	0.1592 BCD	0.0779 BC							
Testigo			0.1649 A	0.055 CD	0.3323 B	0.088 E	0.055 CD							
DMSH			0.4453	0.1276	0.0565	0.0559	0.0333							

700 ppm	10 minutos	C1T2	0.0573	A	0.4679	A	0.3715	A	0.1725	AB	0.0986	A
	15 minutos	C1T3	0.1634	A	0.264	EF	0.0856	CD	0.1496	AB	0.0546	BCD
1000 ppm	5 minutos	C2T1	0.0528	A	0.3856	BC	0.1208	BCD	0.0534	B	0.0444	CD
	10 minutos	C2T2	0.1383	A	0.2509	F	0.0437	D	0.1095	AB	0.0493	BCD
	15 minutos	C2T3	0.2598	A	0.4541	A	0.123	BCD	0.3921	A	0.0445	CD
1200 ppm	5 minutos	C3T1	0.28	A	0.4418	AB	0.1257	BCD	0.1197	AB	0.0338	D
	10 minutos	C3T2	0.1056	A	0.3086	DE	0.2501	AB	0.061	B	0.0383	CD
	15 minutos	C3T3	0.0767	A	0.2275	F	0.1232	BCD	0.0819	B	0.0685	BCA
Testigo			0.1649	A	0.3401	CD	0.2101	BC	0.0709	B	0.0772	BA
DMSH			0.4453		0.0577		0.151		0.2861		0.0333	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 3. Comparación de medias para tasa de transpiración (TRAN)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO₂

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	6	A ^z	5.9139	CD	6.7218	AB	6.8979	A	3.1826	DE
	10 minutos	C1T2	4	A	6.2624	BCD	6.0629	BCD	6.1347	B	3.7231	CD
	15 minutos	C1T3	5	A	7.7425	A	6.368	ABC	6.3857	B	3.0608	E
1000 ppm	5 minutos	C2T1	5	A	6.4136	BC	5.4711	DE	6.3788	B	3.9151	BC
	10 minutos	C2T2	5	A	6.0619	BCD	6.0355	BCD	6.0622	B	3.2627	CDE
	15 minutos	C2T3	5	A	6.6099	B	4.9885	E	5.1567	C	4.387	B
1200 ppm	5 minutos	C3T1	7	A	6.3669	BC	6.5729	AB	4.2131	E	3.6266	CDE
	10 minutos	C3T2	5	A	5.7921	CD	6.7893	A	4.4757	DE	3.6472	CDE
	15 minutos	C3T3	5	A	5.8897	CD	5.7132	CDE	4.7896	CD	4.5431	B
Testigo			6	A	5.6626	D	6.6935	AB	6.3242	B	5.6841	A
DMSH					0.6459		0.7252		0.4662		0.6616	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas

después de la aplicación de CO ₂												
CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	35 dds		50 dds		60 dds		70 dds		80 dds	
700 ppm	5 minutos	C1T1	2.4238	E ^Z	4.9304	CD	6.19	AB	6.8888	AB	4.6757	A
	10 minutos	C1T2	4.2788	B	5.6795	A	6.7827	A	6.3197	AB	4.8205	A
	15 minutos	C1T3	3.7672	BC	4.7602	D	6.451	AB	6.5252	AB	4.13	A
1000 ppm	5 minutos	C2T1	2.7947	DE	5.4833	AB	6.6039	AB	6.5277	AB	3.8809	A
	10 minutos	C2T2	4.2523	B	4.8496	D	6.1566	B	5.9724	C	4.8145	A
	15 minutos	C2T3	3.754	BC	5.4007	AB	6.1835	AB	5.2787	CD	4.1835	A
1200 ppm	5 minutos	C3T1	3.561	BCD	4.7811	D	6.0865	B	5.3157	CD	4.2551	A
	10 minutos	C3T2	3.2353	CDE	4.0994	E	6.776	A	4.5474	D	4.3438	A
	15 minutos	C3T3	3.3962	CD	5.4961	AB	6.4838	AB	5.232	CD	4.4072	A
Testigo			5.4124	A	5.2499	BC	6.6523	AB	6.4012	AB	5.2069	A
DMSH			0.8376		0.3802		0.6144		0.8455		1.5584	

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 4. Comparación de medias para concentración intercelular de CO₂ (CI)

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días después de se realizaron los muestreos horas después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	154.44	BCD ^z	79.363	I	181.46	D	141.48	E	79.363	I
	10 minutos	C1T2	428.38	A	52.318	J	259.87	AB	168.47	B	52.318	J
	15 minutos	C1T3	164.08	BCD	98.315	H	190.47	CD	164.38	C	98.315	H
1000 ppm	5 minutos	C2T1	202.55	BC	159.45	E	249.62	AB	109.65	H	159.45	E
	10 minutos	C2T2	179.52	BCD	146.4	F	220.43	BCD	158.54	D	146.4	F
	15 minutos	C2T3	173.86	BCD	237.61	A	263.57	A	103.52	I	237.61	A
1200 ppm	5 minutos	C3T1	223.27	B	127.48	G	239.58	AB	109.46	H	127.48	G
	10 minutos	C3T2	133.32	CD	181.54	D	230.08	ABC	137.77	G	181.54	D
	15 minutos	C3T3	126.35	D	184.55	C	255.23	AB	139.37	F	184.55	C
Testigo			197.59	BCD	213.44	B	234.6	AB	208.57	A	213.44	B
DMSH			75.909		0.9262		39.718		0.9404		0.8656	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	229.87	B ^Z	263.52	E	188.46	D	102.56	J	128.55	E
	10 minutos	C1T2	378.79	A	237.66	I	217.32	A	141.63	I	96.238	H
	15 minutos	C1T3	151.04	CDE	253.69	G	146.8	F	184.38	D	116.67	G
1000 ppm	5 minutos	C2T1	114.43	EF	244.46	H	155.56	E	142.5	H	226.61	A
	10 minutos	C2T2	153.7	CDE	276.45	C	204.75	C	144.16	G	211.54	B
	15 minutos	C2T3	132.28	DEF	293.57	A	212.04	B	191.19	B	191.56	C
1200 ppm	5 minutos	C3T1	106.86	F	288.47	B	125.56	G	185.48	C	126.48	F
	10 minutos	C3T2	156.44	CD	261.61	F	190.51	D	155.72	E	125.41	F
	15 minutos	C3T3	180.17	C	263.59	E	152.56	E	151.54	F	132.62	D
Testigo			258.93	B	271.43	D	190.38	D	214.31	A	211.52	B
DMSH			39.458		0.8102		4.0278		0.7993		0.8656	

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 5.Comparación de medias para azúcares totales (AZU T)

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	15.601	G ^z	18.227	DE	20.08	A	18.671	A	17.486	A
	10 minutos	C1T2	14.636	H	17.768	E	20.13	A	18.383	A	17.68	A
	15 minutos	C1T3	20.521	D	21.559	D	20.43	A	18.54	A	17.559	A
1000 ppm	5 minutos	C2T1	16.51	F	16.565	F	20.34	A	18.405	A	17.565	A
	10 minutos	C2T2	15.585	G	16.487	F	20.37	A	18.254	A	17.487	A
	15 minutos	C2T3	17.727	E	15.913	B	20.18	A	18.746	A	17.723	A
1200 ppm	5 minutos	C3T1	27.178	A	19.486	C	20.57	A	18.271	A	17.227	A
	10 minutos	C3T2	23.538	B	21.559	A	20.26	A	18.424	A	17.13	A
	15 minutos	C3T3	21.68	C	20.28	C	20.85	A	18.218	A	17.708	A
Testigo			21.507	C	20.23	C	20.16	A	18.22	A	17.28	A
DMSH			0.3774		0.4466		0.5451		0.6432		0.6836	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	15.613	F ^Z	19.659	C	19.197	A	16.283	A	16.287	A
	10 minutos	C1T2	15.768	F	15.517	F	19.796	A	16.318	A	16.534	A
	15 minutos	C1T3	19.566	D	17.557	D	19.351	A	16.595	A	16.728	A
1000 ppm	5 minutos	C2T1	19.35	D	16.455	E	19.51	A	16.488	A	16.502	A
	10 minutos	C2T2	19.5	D	15.687	F	19.442	A	16.446	A	16.28	A
	15 minutos	C2T3	18.562	E	17.563	D	19.508	A	16.801	A	16.652	A
1200 ppm	5 minutos	C3T1	21.484	C	22.472	A	19.469	A	16.723	A	16.547	A
	10 minutos	C3T2	24.403	A ^Z	19.496	C	19.429	A	16.49	A	16.429	A
	15 minutos	C3T3	22.449	B	20.246	B	19.404	A	16.486	A	16.682	A
Testigo			21.491	C	20.348	B	19.639	A	16.434	A	16.28	A
DMSH			0.4568		0.5734		0.613		0.7916		0.6836	

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 6. Comparación de medias para azúcares reductores (AZU R)

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días en los que se realizaron los tests 1 24 horas después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	6.275	CD ^Z	3.5238	G	7.3858	A	5.9486	A	6.5184	A
	10 minutos	C1T2	5.45	CD	8.5486	D	12.468	A	5.5458	A	4.5873	A
	15 minutos	C1T3	7.001	CD	6.8061	E	11.189	A	8.3386	A	10.516	A
1000 ppm	5 minutos	C2T1	4.548	D	4.6341	F	10.475	A	7.4719	A	3.5668	A
	10 minutos	C2T2	8.373	BC	6.3486	E	16.291	A	8.4659	A	3.3587	A
	15 minutos	C2T3	7.638	BCD	3.4191	G	12.587	A	6.3595	A	4.495	A
1200 ppm	5 minutos	C3T1	8.403	BC	11.264	B	8.531	A	5.4867	A	8.407	A
	10 minutos	C3T2	12.411	A	13.414	A	11.228	A	10.486	A	10.218	A
	15 minutos	C3T3	10.54	AB	9.4506	C	16.543	A	6.3886	A	10.771	A
Testigo			10.54	AB	9.591	C	8.5395	A	7.4719	A	6.4441	A
DMSH			3.4434		0.4949		0.3924		0.7534		0.4948	

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	6.275	CD ^z	3.5238	G	8.858	A	7.9486	A	6.5184	A
	10 minutos	C1T2	4.708	D	8.5486	D	8.468	A	7.5458	A	6.5873	A
	15 minutos	C1T3	4.568	D	6.8061	E	8.189	A	7.3386	A	6.516	A
1000 ppm	5 minutos	C2T1	4.548	D	3.4191	G	8.475	A	7.4719	A	6.5668	A
	10 minutos	C2T2	8.373	BC	6.3486	E	8.291	A	7.4659	A	6.3587	A
	15 minutos	C2T3	7.638	BCD	4.6341	F	8.587	A	7.3595	A	6.495	A
1200 ppm	5 minutos	C3T1	7.001	CD	9.4506	C	8.531	A	7.4867	A	6.407	A
	10 minutos	C3T2	12.411	A	13.414	A	8.228	A	7.486	A	6.218	A
	15 minutos	C3T3	10.547	AB	11.264	B	8.543	A	7.3886	A	6.771	A
Testigo			10.537	AB	9.4506	C	8.5395	A	7.4719	A	6.4441	A
DMSH			3.4434		0.4949		0.3924		0.7534		0.4948	

^zMedias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 7. Comparación de medias para clorofila tota I (CLOR)

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizó el muestreo 24 horas después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	51.146	C ^Z	42.442	E	46.888	BC	45.444	DE	42.442	E
	10 minutos	C1T2	57.415	A	45.549	B	50.204	A	49.413	B	45.549	B
	15 minutos	C1T3	48.274	E	41.579	F	45.36	CD	45.272	E	41.579	F
1000 ppm	5 minutos	C2T1	51.206	C	43.612	D	46.111	BC	52.443	A	43.612	D
	10 minutos	C2T2	45.355	F	45.183	B	45.389	CD	48.291	C	45.183	B
	15 minutos	C2T3	50.203	D	44.366	C	44.37	D	43.421	G	44.366	C
1200 ppm	5 minutos	C3T1	50.314	D	42.391	E	47.546	B	40.474	H	42.391	E
	10 minutos	C3T2	52.244	B	41.369	F	45.566	CD	43.419	G	41.369	F
	15 minutos	C3T3	51.196	C	43.558	D	45.459	CD	46.119	D	43.558	D
Testigo			52.101	B	46.592	A	45.412	CD	44.349	F	46.592	A
DMSH			0.5437		1.3072		1.5646		0.7531		0.7027	

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds
700 ppm	5 minutos	C1T1	52.307 BC ^z	43.681 F	47.588 B	46.661 C	44.424 D
	10 minutos	C1T2	55.448 A	40.21 G	49.369 A	50.401 A	47.232 A
	15 minutos	C1T3	51.08 C	46.406 DE	47.539 B	46.364 C	40.492 G
1000 ppm	5 minutos	C2T1	53.33 B	45.699 E	45.595 DE	50.418 A	44.844 CD
	10 minutos	C2T2	55.896 A	49.232 B	45.54 DE	50.677 A	46.425 B
	15 minutos	C2T3	51.649 BC	46.745 CD	45.458 E	50.529 A	45.578 C
1200 ppm	5 minutos	C3T1	52.431 BC	46.374 DE	46.326 CD	43.214 E	41.612 F
	10 minutos	C3T2	52.28 BC	47.393 C	46.489 C	44.312 D	43.354 E
	15 minutos	C3T3	47.444 D	53.63 A	46.186 CDE	47.675 B	45.431 C
Testigo			52.886 BC	47.335 C	46.031 CDE	47.496 B	46.524 AB
DMSH			2.0714	0.8562	0.8628	0.8005	0.7027

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

Cuadro 8.Comparación de medias para fenoles (FEN)

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	3.2741	A ^z	3	A	3.2707	B	2.5211	B	3.5189	A
	10 minutos	C1T2	3.1862	A	3	A	3.2575	B	2.5992	B	2.4649	BC
	15 minutos	C1T3	3.2512	A	3	A	2.5008	C	0.2354	F	2.2109	C
1000 ppm	5 minutos	C2T1	3.1395	A	2	A	1.7544	D	1.0384	D	2.3767	BC
	10 minutos	C2T2	3.2051	A	3	A	3.8983	A	0.8617	DE	3.1568	A
	15 minutos	C2T3	2.9924	A	3	A	3.3647	B	1.7208	C	2.3304	BC
1200 ppm	5 minutos	C3T1	3.3317	A	2	A	1.298	E	3.3733	A	2.9093	AB
	10 minutos	C3T2	3.2848	A	3	A	2.533	C	0.3943	EF	3.3448	A
	15 minutos	C3T3	3.186	A	3	A	1.4784	DE	1.7821	C	2.4898	BC
Testigo			3.198	A	9131	A	2.5588	C	0.2791	F	3.3331	A
DMSH			0.5869		13924		0.3628		0.5483		0.6323	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

CONCENTRACIÓN	TIEMPO	Nomenclatura	Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂									
			35 dds	50 dds	60 dds	70 dds	80 dds					
700 ppm	5 minutos	C1T1	3.262	BCZ	3.148	B	2.6842	CDE	2.7759	AB	3.148	B
	10 minutos	C1T2	2.6755	CD	3.1294	B	3.0704	BCD	2.4908	B	3.1294	B
	15 minutos	C1T3	3.2196	BCD	1.4061	D	4.5767	A	2.4044	B	1.4061	D
1000 ppm	5 minutos	C2T1	2.5898	D	2.1385	C	3.7416	B	1.7178	CD	2.1385	C
	10 minutos	C2T2	3.6485	B	3.07	B	3.352	BC	2.2184	BC	3.07	B
	15 minutos	C2T3	3.1901	BCD	1.6891	CD	3.537	B	2.7256	AB	1.6891	CD
1200 ppm	5 minutos	C3T1	4.4556	A	1.643	CD	1.7729	FG	3.2182	A	1.643	CD
	10 minutos	C3T2	3.3832	B	3.3602	B	2.5512	DE	2.3793	B	3.3602	B
	15 minutos	C3T3	3.3934	B	1.5478	CD	1.3265	G	1.3759	D	1.5478	CD
Testigo			3.4255	B	4.428	A	2.2872	EF	0.352	E	4.428	A
DMSH			0.6562		0.6309		0.7541		0.6068		0.6323	

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

APÉNDICE 2. Análisis de varianza

Cuadro 9. Análisis de varianza de tasa fotosintética (FOT)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	35.4941896		45.0004306		3.74166137		21.7896943		45.0004306	
ERROR	30	0.2190331		1.6614968		0.19186485		0.1017972		1.6614968	
TOTAL	39										
CV		2.604663		9.627457		2.817647		2.508606		9.627457	
MEDIA		17.96815		13.38869		15.54573		12.71849		13.38869	

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	12.7149114		33.2772113		11.389253		21.5690838		13.68803	
ERROR	30	1.0770228		0.4547703		0.1520219		0.4198488		0.2227927	
TOTAL	39										
CV		4.843353		3.897663		3.477746		4.963847		4.806031	
MEDIA		21.42725		17.30182		11.21128		13.05353		9.821186	

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 10. Análisis de varianza de conductancia (COND)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	ns	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	6911657		0.00716884		0.01917564		0.00609437		0.00716884	
ERROR	30	69116635		0.00019012		0.00052857		0.00053645		0.00019012	
TOTAL	39										
CV		632.4274		16.6247		7.358744		15.13436		16.6247	
MEDIA		4157.006		0.08294		0.312425		0.153039		0.08294	

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	ns	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	0.02425415		0.03050379		0.03780058		0.03911665		0.001576	
ERROR	30	0.03408642		0.00057218		0.0039184		0.01407059		0.00016489	
TOTAL	39										
CV		127.7127		6.829703		37.01527		89.50744		22.81253	
MEDIA		0.144563		0.350238		0.169112		0.132525		0.056289	

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns. significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂										
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds
TRAT	9	1920719335		1.43370099		1.42221135		3.51385828		2.50173155
ERROR	30	1920883741		0.07171324		0.08701833		0.03736299		0.07522517
TOTAL	39									
CV		632.0206		4.269979		4.81416		3.401956		7.026809
MEDIA		6934.566		6.271536		6.127522		5.681881		3.903224

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	ns	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	2.82395525		0.91333138		0.28346617		2.31030596		0.63891869	
ERROR	30	0.12057288		0.02484105		0.06488244		0.1228601		0.41743137	
TOTAL	39										
CV		9.416388		3.106839		3.957364		5.940047		14.44805	

MEDIA 3.687572 5.073015 6.436615 5.900864 4.471809

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Quadro 12 Análisis de varianza de concentración intercelular de CO₂(CI)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	29788.2141		14072.2053		3156.44182		4209.80352		14072.2053	
ERROR	30	990.3903		0.1288		261.03634		0.15198		0.1288	
TOTAL	39										
CV		15.86737		0.2424		6.950957		0.270503		0.2424	
MEDIA		198.3345		0.2424		232.4373		144.1207		148.0476	

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	27491.944		1266.79262		3871.87063		4191.82679		9172.44488	
ERROR	30	267.6062		0.11282		2.78838		0.10982		0.40235	
TOTAL	39										
CV		8.783077		0.126537		0.936037		0.205392		0.404736	
MEDIA		186.2522		265.4447		178.3951		161.3463		156.7218	

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 13. Análisis de varianza de azúcares totales (AZU T)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂										
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	ns	70 dds	ns	80 dds
TRAT	9	67.2663256		12.7676523		14.417176		16.3564895		12.7676523
ERROR	30	0.0244842		0.0803144		0.0491744		0.071108		0.0803144
TOTAL	39									
CV		0.804568	**	1.551029	**	0.978038		1.522633		1.551029
MEDIA		21.44825		20.27161		20.06642		18.51314		17.27161

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂										
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	ns	70 dds	ns	80 dds
TRAT	9	32.0925723		19.5326925		21.2719467		37.2931716		34.1374351
ERROR	30	0.03587		0.0565111		0.0645868		0.1077018		0.0517344
TOTAL	39									
CV		0.856266		1.298924		1.064488		1.782955		1.22571
MEDIA		21.11859		20.30136		19.87433		16.92879		16.55675

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 14. Análisis de varianza de azúcares reductores (AZU R)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	ns	50 dds	ns	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	67.2663256		12.7676523		14.417176		16.3564895		12.7676523	
ERROR	30	0.0244842		0.0803144		0.0491744		0.071108		0.0803144	
TOTAL	39										
CV		0.804568		1.551029		0.978038		1.522633		1.551029	
MEDIA		10.44825		9.27161		8.67327		7.51314		6.27161	

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	ns	50 dds	ns	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	32.0925723		19.5326925		21.2719467		37.2931716		34.1374351	
ERROR	30	0.03587		0.0565111		0.0645868		0.1077018		0.0517344	
TOTAL	39										
CV		0.856266		1.298924		1.064488		1.782955		1.22571	
MEDIA		10.11859		9.30136		8.87433		7.328179		6.55675	

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 15. Análisis de varianza de clorofila total (CLOR)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO ₂										
FV	GL	35 dds	**	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	80 dds	**
TRAT	9	37.5078972		12.2968111		10.8565686		46.9542271	12.2968111	
ERROR	30	0.0508164		0.0848773		0.4050933		0.0974756	0.0848773	
TOTAL	39									
CV		0.442482		0.667222		1.376102		0.680722	0.667222	
MEDIA		50.94552		43.66421		46.25161		45.86465	43.66421	

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO ₂											
FV	GL	35 dds	**	50 dds		60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	21.9746291		47.8842264		6.0194922		29.3330797		19.1378056	
ERROR	30	0.7374897		0.1260128		0.12793767		0.1101353		0.1028088	
TOTAL	39										
CV		1.636536		0.760615		0.767362		0.694651		0.719057	

MEDIA	52.475	46.67051	46.6121	47.77458	44.59147
-------	--------	----------	---------	----------	----------

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 16. Análisis de varianza de fenoles (FEN)

Días a los que se realizaron los muestreos 1 hora después de la aplicación de CO₂

FV	GL	35 dds	ns	50 dds	**	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	1.06513469		4.08554603		3.71310806		2.7193457		4.08554603	
ERROR	30	0.07401041		0.06872731		0.09410951		0.06328517		0.06872731	
TOTAL	39										
CV		8.183621		10.25661		10.55862		11.61524		10.25661	
MEDIA		3.324305		2.556		2.905423		2.165823		2.556	

Días a los que se realizaron los muestreos 24 horas después de la aplicación de CO₂

FV	GL	35 dds	ns	50 dds	60 dds	**	70 dds	**	80 dds	**
TRAT	9	0.03537474		33326846	3.03825588		4.80773949		0.97357032	

ERROR	30	0.05920353	33322032	0.02262125	0.05166875	0.07338131
TOTAL	39					
CV		7.592055	630.5486	5.80383	15.35328	9.628043
MEDIA		3.2049	915.4765	2.591455	1.480515	2.813551

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: Tratamiento, CV: coeficiente de variación. **, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$