

Concentración de almidón y proteínas solubles en tubérculos de *Caladium bicolor* en diferentes etapas fenológicas*

Concentration of Starch and soluble proteins in tubers of *Caladium bicolor* under different phenological stages

Ixchel Abby Ortiz Sánchez¹, Vicente de Paul Álvarez Reyna¹, Guillermo González Cervantes², Luis Manuel Valenzuela Núñez^{3§}, María del Carmen Potisek Talavera² y Jorge Armando Chávez Simental⁴

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Unidad Laguna. Carretera a Santa Fe y Periférico S/N. C. P. 27000. A. P. 940. Torreón, Coahuila, México. Tel y Fax: 871 73 31 210; 7331090; 7330067. ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Unidad Laguna. Carretera a Santa Fe y Periférico S/N. C. P. 27000. A. P. 940. Torreón, Coahuila, México. Tel y Fax: 871 73 31 210; 7331090; 7330067. ³Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad S/N. Fracc. Filadelfia. C. P. 35010. Gómez Palacio, Dgo. Tel y Fax: 871 7152077. ⁴INIFAP CENID-RASPA, km. 6.5 Margen Derecha Canal de Sacramento. Ejido Las Huertas, C. P. 35100. Gómez Palacio, Dgo. Tels. (871) 1590104; 1590105 y 1590107. ⁵Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Boulevard del Guadiana 501. Ciudad Universitaria C. P. 34120. Durango, Dgo. Tels. (618) 8251886 y 8280378. [§]Autor para correspondencia: luisvn70@hotmail.com.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la concentración de almidón y proteínas solubles (mg g^{-1} de MS) en tubérculos de *Caladium bicolor* mediante la aplicación de productos orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos) diluidos en el agua de riego. Los tratamientos consistieron en la interacción de tres dosis de producto orgánico (0 (testigo), 4 y 8 ml L^{-1}) y tres etapas fenológicas del cultivo (floración, predormancia y dormancia). Las variables fueron medidas en base a la técnica de espectrofotometría UV-visible, mediante modelos matemáticos derivados de curvas de calibración para cada compuesto orgánico. Los datos obtenidos fueron analizados bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3×3 . Los tratamientos con 8 y 4 ml L^{-1} de producto orgánico (ácidos húmicos y fúlvicos) en la etapa de dormancia, presentaron mayor concentración de almidón con 885.18 y 833.97 mg g^{-1} de MS respectivamente. Por otra parte, se obtuvo la mayor concentración de proteínas solubles en los tratamientos de 4 y 8 ml L^{-1} en la etapa de floración con 156.04 y 150.54 mg g^{-1} de MS respectivamente. Bajo las condiciones en las que se desarrolló la presente investigación, se concluye que la aplicación de productos orgánicos genera mayor

Abstract

In this paper the concentration of starch and soluble proteins (mg g^{-1} DM) in tubers of *Caladium bicolor* was evaluated through the application of organic products (humic and fulvic acids) diluted in irrigation water. Treatments consisted in the interaction of three doses of organic product (0 (control), 4 and 8 ml L^{-1}) and three phenological stages of the crop (flowering, predormancy and dormancy). The variables were measured based on UV-visible spectrophotometry, using mathematical models derived from calibration curves of each organic compound. The data was analyzed under a completely randomized design with a factorial arrange 3×3 . The treatments with 8 and 4 ml L^{-1} of organic product (humic and fulvic acids) on dormancy stage showed higher concentration of starch with 885.18 and 833.97 mg g^{-1} DM respectively. Furthermore, the highest concentration of soluble proteins in treatment of 4 and 8 ml L^{-1} was obtained at flowering stage with 156.04 and 150.54 mg g^{-1} DM respectively. Under the conditions in which this research was conducted, it is concluded that the application of organic products generates greater concentration of vegetative storage in tubers of this crop, which will serve to produce bigger and more shoots for the next production cycle.

* Recibido: noviembre de 2014
Aceptado: marzo de 2015

concentración de reservas vegetativas en el tubérculo de este cultivo, lo cual servirá para que produzca brotes en mayor tamaño y cantidad para el siguiente ciclo de producción.

Palabras clave: *Caladium*, cultivo ornamental, fertilización, reservas vegetativas.

Introducción

Debido a su popularidad y versatilidad, el *Caladium bicolor* ha sido una planta ornamental de gran valor que no se limita exclusivamente a las zonas tropicales de las cuales es originario, ya que puede ser utilizado con éxito en maceta y en los jardines en gran parte de Estados Unidos de América (Evans *et al.*, 1993), con mejora de las técnicas de almacenamiento de tubérculos que le permite desarrollarse en condiciones de jardín aún en condiciones de ambiente seco (Mayol *et al.*, 1997).

El interés comercial de esta planta es que se puede utilizar casi año alrededor tanto en el comercio de la floristería tradicional y para jardines interiores en las situaciones donde se desea color adicional. *Caladium bicolor* forma parte de la amplia variedad de plantas que durante su ciclo de vida almacenan reservas vegetativas como es el caso de almidón y proteínas que las plantas necesitan para generar mayores brotes en el ciclo siguiente, como en árboles frutales, algunas hortalizas (papa y zanahoria) y otras plantas ornamentales. El almidón es una de las principales reservas, que se sintetiza a partir del dióxido de carbono capturado de la atmósfera y agua proveniente del suelo. Es el carbohidrato más abundante en las plantas y se encuentra en hojas, diferentes tipos de tallos y raíces así como en flores, frutos, semillas y tubérculos; en éste último, se utiliza como fuente de energía durante periodos de dormancia, estrés o reinicio del crecimiento (Scott *et al.*, 2000, Baguma *et al.*, 2003; Tester *et al.*, 2004).

Las plantas bulbosas de especies ornamentales como *Caladium bicolor* presentan órganos subterráneos en forma de tubérculos que funcionan como un órgano de reserva y de almacenamiento masivo para una gama de macromoléculas, principalmente almidón y proteínas (Ewing y Wareing 1978). Estas especies suelen perder su parte aérea durante la época de invierno y permanecen en reposo gracias a las reservas almacenadas en sus tubérculos. Al inicio de primavera cuando las condiciones estacionales vuelven a ser favorables para el cultivo, dichas reservas sustentan el nuevo ciclo de crecimiento (Hartmann y Kester, 1999).

Keywords: *Caladium*, fertilization, ornamental plants, vegetative reserves.

Introduction

Due to its popularity and versatility, *Caladium bicolor* has been an ornamental plant of great value that is not confined to the tropics of which it originated, since it can be used successfully in pots and gardens along the United States of America (Evans *et al.*, 1993), with improved storage techniques of tubers that allow them to grow under conditions of garden, even under dry conditions (Mayol *et al.*, 1997).

The commercial interest of this plant is that it can be used almost all year both trade of traditional florist and indoor gardens in situations where additional color is desired. *Caladium bicolor* is part of a wide variety of plants that during their life cycle stores vegetative reserves such as starch and proteins that plants need to generate bigger shoots in the next cycle, as in fruit trees, some vegetables (potatoes and carrot) and other ornamental plants. Starch is a major reserve, which are synthesized from carbon dioxide captured from the atmosphere and soil water. It is the most abundant carbohydrate in plants and is found in leaves, different types of stem and roots as well as in flowers, fruits, seeds and tubers; in the latter, it is used as an energy source during periods of dormancy, stress or to restart growth (Scott *et al.*, 2000, Baguma *et al.*, 2003; Tester *et al.*, 2004).

Ornamental Bulbous plants such as *Caladium bicolor* have underground tuber shaped organs that work as a storage organ and massive storage for a range of macromolecules, mainly starch and proteins (Ewing and Wareing, 1978). These species tend to lose their aerial part during the winter time and remain latent thanks to the reserves stored in their tubers. At the beginning of spring when seasonal conditions become favorable for cultivation, such reserves support the new growth cycle (Hartmann and Kester, 1999).

Photosynthesis is of vital importance in plants since after the formation of glucose, is carried out a series of sequences of other chemical reactions leading to the formation of starch and other carbohydrates. From these products, the plant produces lipids and proteins required for the formation of plant tissue, inducing growth. Proteins are the main organic constituents of protoplasm, extremely complex substances

La fotosíntesis es de vital importancia en las plantas ya que después de la formación de glucosa, se lleva a cabo una serie de secuencias de otras reacciones químicas que dan lugar a la formación de almidón y otros carbohidratos. A partir de estos productos, la planta elabora lípidos y proteínas necesarios para la formación del tejido vegetal, lo que induce el crecimiento. Las proteínas son los principales constituyentes orgánicos del protoplasma, sustancias sumamente complejas de naturaleza nitrogenada de alto peso molecular que se diferencian en la forma, las propiedades de superficie, de tamaño y función. Sin embargo, todas tienen en común el hecho de que se construyen a partir de aminoácidos (y por lo tanto poseen las propiedades tanto de un ácido y de base) además de que tienen propiedades coloidales (Kozlowsky y Pallardy, 1997).

Cada molécula proteica tiene constituyentes y estructura particulares que se mantienen en tanto la proteína conserve su actividad. Las proteínas de reserva vegetativa (VSP) por sus siglas en inglés corresponden a un grupo heterogéneo, y sólo pueden ser identificadas por la acumulación temporal en órganos en etapa de dormancia y la pérdida durante la temporada de crecimiento (Staswick, 1994, citado por Valenzuela, *et al.*, 2011). Las VSP son proteínas altamente enriquecidas con nitrógeno que son intensamente movilizadas para la reactivación de órganos en primavera, incluyendo la expansión de las hojas y crecimiento cambial.

Estas proteínas se identificaron por primera vez en árboles frutales (O'Kennedy y Titus, 1979) y en álamo (Sauter *et al.*, 1990, Stepien y Martin, 1994). El *Caladium bicolor* se propaga principalmente por tubérculo (Shah *et al.*, 2007), por lo cual es importante inducir su propagación mediante el uso de productos que estimulen su desarrollo (Péret *et al.*, 2009).

La utilización de productos orgánicos que permiten a los agricultores obtener mayor rendimiento sin alterar el medio ambiente, es una de las tendencias mundiales de nuestros tiempos. Se les atribuye el mejoramiento de la calidad de cultivos, como en papa, donde mejora la distribución de los almidones y uniformiza el tamaño. En trigo aumenta los contenidos de proteínas; en tomate, chile y otras hortalizas aumenta el porcentaje de fruto de exportación (Potisek *et al.*, 2013).

Existen productos orgánicos como los ácidos húmicos, los cuales tienen una gran capacidad para retener y transportar nutrientes, metales, pesticidas, etcétera; además son la fuente más importante de carbono orgánico terrestre y acuático (Álvarez *et al.*, 2004; Brigante *et al.*, 2006). Los ácidos

de nitrogenous nature with high molecular weight that differs in shape, surface properties, size and function. However, all have in common the fact that they are constructed from amino acids (and thus possess the properties of both an acid and base) plus they have colloidal properties (Kozlowski and Pallardy, 1997).

Each protein molecule has constituents and specific structure that are maintained while the protein preserves its activity. Vegetative storage proteins (VSP) for its acronym in English correspond to a heterogeneous group, and can only be identified by temporary accumulation in organs during dormancy stage and loss during the growing season (Staswick, 1994, quoted by Valenzuela *et al.*, 2011). VSP are highly enriched proteins with nitrogen that are strongly mobilized to reactivate organs in spring, including leaves expansion and cambial growth.

These proteins were first identified in fruit trees (O'Kennedy and Titus, 1979) and in Fremont cottonwood (Sauter *et al.*, 1990, Stepien and Martin, 1994). *Caladium bicolor* is mainly propagated as tubercle (Shah *et al.*, 2007), so it is important to induce its propagation using products that stimulate their development (Peret *et al.*, 2009).

The use of organic products that allow farmers to obtain higher yield without altering the environment, is one of the global trends of our times; are accounted for improving the quality of crops, such as potatoes, which improves the distribution of starches and standardizes size. In wheat protein content increases; in tomatoes, peppers and other vegetables increases the percentage of fruit export (Potisek *et al.*, 2013).

There are organic products such as humic acids, which have a high capacity to retain and transport nutrients, metals, pesticides, etc. they are also the most important source of terrestrial and aquatic organic carbon (Álvarez *et al.*, 2004; Brigante *et al.*, 2006). Humic acids activate biochemical processes in plants such as respiration and photosynthesis, which increases chlorophyll content, nutrient uptake, growth of soil microorganism, root development, quality and yield of many plants (Aganga and increases Tshwenyane, 2003).

Viser (1986), classify plants into three groups based on the response shown by the application of humic substances, where the tuberous group, rich in carbohydrates such as potatoes, beets and carrots have a strong reaction and, under optimal conditions it can get an increase of up to 50% in yield.

húmicos activan los procesos bioquímicos en plantas, como la respiración y fotosíntesis, con lo que se incrementa el contenido de clorofila, absorción de nutrientes, crecimiento de organismos del suelo, desarrollo de raíces, calidad y rendimientos de muchas plantas (Aganga y Tshwenyane, 2003).

Viser (1986), clasifica a las plantas en tres grupos en base a la respuesta que manifiestan a la aplicación de sustancias húmicas, donde el grupo de tuberosas ricas en carbohidratos como la papa, betabel y zanahoria presentan una fuerte reacción y, bajo condiciones óptimas se puede obtener hasta 50% de incremento en rendimiento.

Debido a que se está introduciendo esta planta ornamental a la región donde las condiciones climáticas son diferentes a los de su origen, es necesario conocer su fenología, y con la aplicación de productos orgánicos se pretende satisfacer las necesidades nutricionales e incrementar la concentración de almidón y proteínas solubles en el tubérculo de este cultivo para incrementar las reservas vegetativas y generar mayores y mejores brotes en posteriores ciclos, así como estimular su pronta adaptabilidad a las condiciones adversas que deberá enfrentar en esta región.

Material y métodos

Localización del sitio experimental

El experimento se realizó en los meses de agosto a diciembre de 2012 en las instalaciones del invernadero ubicado en el fraccionamiento "Las Trojes", carretera antigua Torreón - San Pedro km 5 en Torreón, Coahuila.

Productos orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos)

En la Comarca Lagunera existen aproximadamente 400 mil cabezas de ganado, que generan al día 520 toneladas de excretas, siendo un foco de infección y contaminación para las vacas y cuerpos de agua. El producto orgánico se obtiene mediante la elaboración de composta, en seguida se deposita en recipientes de 30 mil litros y se añade agua y un hidróxido de potasio (López, 2009); finalmente se realiza la licuefacción durante 7 días para desprender los grupos funcionales y obtener los ácidos húmicos y fúlvicos en concentraciones de 10 y 6% respectivamente, el resto de producto son macro y microelementos (ppm).

Due to this ornamental plant is being introduced to the region where climatic conditions are different from those of its origin, it is necessary to know its phenology, and with the application of organic products is intended to fulfill the nutritional needs and increase the concentration of starch and soluble proteins in the tuber of this crop to increase vegetative reserves and generate higher and better shoots in subsequent cycles, as well as to stimulate their prompt adaptability to adverse conditions that will face in this region.

Materials and methods

Location of the experimental site

The experiment was conducted in the months of August to December 2012 in the greenhouse facilities located in the housing state "Las Trojes" old road Torreón - San Pedro km 5 in Torreón, Coahuila.

Organic products (humic and fulvic acids)

In the Laguna Region there are approximately 400 000 heads of cattle, that generate 520 tons per day of manure, being a focus of infection and contamination for cows and water bodies. The organic product is obtained by composting and then deposited in containers of 30 000 liters with water and potassium hydroxide (López, 2009); eventually liquefaction is performed for 7 days to release the functional groups and obtain humic and fulvic acids at concentrations of 10 and 6% respectively, the rest of the product are macro and microelements (ppm).

Experimental area and treatments distribution

Treatments consisted in the interaction of three doses of organic product (0 (as control), 4 and 8 ml L⁻¹) and three phenological stages (flowering, predormancy and dormancy). Three pots were randomly selected per dose of product at each stage of the crop; these samples were subjected to the corresponding biochemical analysis to determine the concentration of starch and protein in tuber of *Caladium*. The treatments were distributed under a completely randomized design with a factorial arrangement 3 * 3, where the factors and levels are shown in Table 1, resulting in a total of nine treatments. For data analysis was used SAS software Ver. 9.11® (Statistical Analysis System, 1998).

Área experimental y distribución de tratamientos

Los tratamientos consistieron en la interacción de tres dosis de producto orgánico (0 (como testigo), 4 y 8 ml L⁻¹) y tres etapas fenológicas del cultivo (floración, predormancia y dormancia). Se seleccionaron aleatoriamente tres macetas por dosis de producto en cada etapa del cultivo; a estas muestras se les realizó el análisis bioquímico correspondiente para determinar la concentración de almidón y proteína en tubérculo de *Caladium*. Los tratamientos fueron distribuidos bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3*3, donde los factores y niveles se muestran en el Cuadro 1, resultando un total de nueve tratamientos. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el software SAS Ver. 9.11[®] (Statistical Analysis System, 1998).

Siembra y aplicación de tratamientos

La siembra de los tubérculos de *Caladium bicolor* se llevó a cabo en el mes de agosto, el tubérculo se sembró en sustrato Peat moss[®], en macetas de plástico de color negro con un volumen de 11 L a una profundidad de 10 cm colocado al centro de la maceta.

La aplicación de los tratamientos se realizó a los 8 días después de la siembra, y una segunda aplicación se efectuó en la etapa de floración. Las variables independientes fueron los tratamientos (dosis de producto orgánico) y las etapas fenológicas del cultivo (floración, pre-dormancia y dormancia) y la variable dependiente fue la concentración de almidón y proteínas solubles en el tubérculo de *Caladium* (mg g⁻¹ de materia seca), lo cual se realizó mediante la técnica de espectrofotometría UV- visible.

Técnica de espectrofotometría UV- visible

El análisis para determinar la concentración de almidón y proteínas solubles en tubérculo de *Caladium bicolor* se realizó en dos laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del estado de Durango en el Laboratorio de Biología y Ecología Forestal y en el laboratorio de Biología Molecular.

Pre tratamiento de muestras de caladio (*Caladium bicolor*)

El proceso para determinar la concentración de almidón y proteínas solubles consistió en tomar tres muestras al azar por tratamiento en cada etapa fenológica: floración, pre-

Cuadro 1. Descripción de factores y niveles.
Table 1. Description of factors and levels.

Factor	Nivel
Dosis de productos orgánicos	4 ml L ⁻¹
	8 ml L ⁻¹
	Testigo (0)
Etapa vegetativa	Floración
	Pre- dormancia
	Dormancia

Sowing and application of treatments

Planting tubers of *Caladium bicolor* was conducted in the month of August; the tuber was planted in Peat moss[®] substrate in black plastic pots with a volume of 11 L at a depth of 10 cm placed in the center of the pot.

The application of the treatments was done 8 days after sowing, and a second application was made at flowering. The independent variables were treatments (dose of organic product) and phenological stages (flowering, predormancy and dormancy) and the dependent variable was the concentration of starch and soluble proteins in tuber of *Caladium* (mg g⁻¹ dry matter), which was performed by UV-visible spectrophotometry.

UV-visible spectrophotometry

The analysis to determine the concentration of starch and soluble proteins in tuber of *Caladium bicolor* was made in two laboratories of the faculty of Biological Sciences from the Universidad Juárez, Durango at the Laboratory of Biology and Forest Ecology and at the Molecular Biology Laboratory.

Pretreatment of caladium samples (*Caladium bicolor*)

The process to determine the concentration of starch and soluble proteins consisted in taking three random samples per treatment at each phenological stage: flowering, predormancy and dormancy. The plant was extracted from the pot and the substrate was removed to wash and separate the tuber from the plant.

Cleaned tubers were cut into small pieces and placed in foil pouches to immerse them in liquid nitrogen and subsequently place them in an ultra-freezer Revco[®] Value Plus Thermo Scientific[®] at -80 °C, in order to stop

dormancia y dormancia. La planta se extrajo de la maceta y se retiró el sustrato para lavar y separar el tubérculo de la planta.

Los tubérculos limpios, se cortaron en trozos pequeños y se introdujeron en bolsas de papel aluminio para sumergirlas en nitrógeno líquido y posteriormente colocarlas en el ultracongelador marca Revco® ValuePlus Thermo Scientific® a -80 °C, con el fin de detener los procesos enzimáticos; de esta forma, las muestras pueden ser almacenadas por meses sin afectar la concentración de reservas vegetativas.

Las muestras fueron sometidas a un proceso de liofilización (Liofilizador Labconco®), durante una semana para extraer la humedad de las muestras. Este proceso consiste en pasar el agua en estado sólido directamente a un estado gaseoso sin pasar por estado líquido, de esta forma no se presenta degradación enzimática. Una vez liofilizadas las muestras, se molieron en un molino Thomas Wiley Cientific® hasta obtener un polvo fino, se tomó el peso seco de las muestras y se almacenaron en vasos esterilizados con tapa para determinar la concentración de almidón y proteínas solubles.

Metodología para determinar la concentración de almidón

Para cuantificar el almidón, primero se estableció una curva de calibración utilizando almidón de arroz de marca Sigma-Aldrich® como estándar, realizando concentraciones conocidas para su lectura en el espectrofotómetro UV- visible marca Genesys 20® Thermo Scientific®.

Para determinar la concentración de almidón, se pesaron 10 mg de materia seca en microtubos de 2 ml con una balanza analítica (Pioneer Ohaus®); se agregó 1 ml de agua destilada a la materia seca, mezclando en un Vortex® (Thermo Scientific®) a 6 500 rpm durante un min. Posteriormente la mezcla se hirvió a 100 °C en una estufa eléctrica durante 10 min para permitir la gelatinización del almidón; enseguida fueron centrifugadas (Spectrafuge 16 M® Labnet International®) a 2 500 rpm durante dos minutos para eliminar los restos de tejido. Del sobrenadante se tomaron 300 µl con una micropipeta (Eppendorf Research®), se colocaron en un microtubo y se añadieron 900 µl de etanol puro para precipitar el almidón; a continuación se centrifugó el microtubo a 10 000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se desechó.

the enzymatic processes; in this manner, samples can be stored for months without affecting the concentration of vegetative reserves.

The samples were subjected to a freeze-drying process (Freeze Labconco®), for a week to remove moisture from the samples. This process involves passing water in solid state directly to a gaseous state without passing through the liquid state, thus no enzymatic degradation occurs. Once lyophilized the samples were ground in a mill Thomas Wiley Cientific® till a fine powder was obtained, the dry weight of the samples was recorded and stored in sterile cups with cap to determine the concentration of starch and soluble proteins.

Methodology to determine the concentration of starch

To quantify starch, first a calibration curve using rice starch from Sigma-Aldrich was established as a standard, making known concentrations for its reading in the UV-visible spectrophotometer Genesys 20® Thermo Scientific®.

To determine the concentration of starch, 10 mg of dry matter were weighed in microtubes of 2ml with an analytical scale (Pioneer Ohaus®); 1 ml of distilled water was added to dry matter, mixing in a Vortex® (Thermo Scientific®) at 6500 rpm for one min. Then the mixture was boiled at 100 °C in an electric oven for 10 min to allow starch gelatinization; then centrifuged (Spectrafuge 16 M® Labnet International®) at 2500 rpm for two minutes to remove tissue debris. From the supernatant 300 µl were taken with a micropipette (Eppendorf Research®), placed in a microtube and added 900 µl absolute ethanol to precipitate the starch; then the microtube was centrifuged at 10 000 rpm for 5 min and discarded the supernatant.

The precipitated starch was re suspended in 1 ml of distilled water with vigorous stirring in a vortex for 3 min. To the microtubes were added 50 µl of iodine solution and the content was placed in special cells to read them in a spectrophotometer. These were introduced into the UV-visible spectrophotometer Genesys® Thermo Scientific® and absorbance was read at a wavelength of 595 nm. Starch concentration from the samples was calculated using absorbance of each of the samples and the calibration curve from starch described above.

El almidón precipitado se re suspendió en 1 ml de agua destilada con agitación vigorosa por 3 min en vortex. A los microtubos se les adicionaron 50 μ l de solución de yodo y el contenido se colocó en celdillas especiales para leer en espectrofotometría. Estas se introdujeron en el espectrofotómetro UV- visible Genesys® Thermo Scientific® y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de almidón en las muestras se calculó usando la lectura de absorbancia de cada una de las muestras y el modelo de la curva de calibración de almidón anteriormente descrita.

Metodología para determinar la concentración de proteínas solubles

Para el método cuantitativo de proteínas totales solubles, primero se estableció una curva de calibración donde se utilizó una solución de Bovine Serum Albumine Bio Rad® como estándar para preparar concentraciones conocidas; las lecturas de absorbancia se obtuvieron en el espectrofotómetro UV- visible (Genesys 20® Thermo Scientific®).

Para determinar la concentración de proteínas solubles en las muestras de caladio (*Caladium bicolor*), se pesaron 10 mg de materia seca en una balanza analítica (Pioneer Ohaus®) en microtubos de 2 ml, se preparó una solución de extracción de proteínas (0.1 MKH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄ y 10% PVP), a la muestra en los microtubos se les colocó un balón de acero y se les agregó 1 ml de la solución de extracción, se realizó una agitación en un Vortex® (Thermo Scientific®) por 10 minutos para romper las paredes celulares. Se centrifugó a 10 000 rpm a 4 °C en una centrifuga con refrigeración (Axyspinr Refrigerated Microcentipge®) por 15 min, para después extraer 500 μ l de cada microtubo y colocarlos en las celdillas para espectrofotómetro, a las que se le agregaron 500 μ l de solución Quickstart Bradford BioRad®; se agitaron y se dejaron reposar por 5 minutos, para posteriormente obtener las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas totales solubles en las muestras se calculó usando la lectura de absorbancia de cada una de las muestras y el modelo de la curva de calibración de proteínas solubles anteriormente descrita.

Resultados y discusión

Los datos se tomaron a lo largo del ciclo vegetativo de *Caladium bicolor*, desde la etapa de floración a la etapa de dormancia, que representaron cinco meses del desarrollo

Methodology to determine the concentration of soluble proteins

For the Quantitative method of total soluble protein, first a calibration curve where a solution of Bovine Serum Albumine Bio Rad® was used as standard to prepare known concentrations was established; absorbance readings were obtained from UV-visible spectrophotometer (Genesys 20® Thermo Scientific®).

To determine the concentration of soluble protein in the samples (*Caladium bicolor*), 10 mg of dry matter were weighed on an analytical scale (Pioneer Ohaus®) in 2 ml microtubes, a protein extraction solution was prepared (0.1 MKH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄ and 10% PVP), a steel ball was placed in the sample from the microtubes and added 1 ml of extraction solution, stirring was performed in a Vortex® (Thermo Scientific®) for 10 minutes to break cell walls. Centrifuged at 10 000 rpm at 4 °C in a refrigerated centrifuge (Axyspinr Refrigerated Microcentipge®) for 15 min, to extract 500 μ l of each microtube and place it in the cells for spectrophotometry, to which were added 500 μ l of solution Quickstart Bradford BioRad®; stirred and allowed to stand for 5 minutes, then obtain absorbance readings at a wavelength of 595 nm. The total soluble protein concentration in the samples was calculated using absorbance reading of each of the samples and calibration curve of soluble proteins described above.

Results and discussion

Data was collected throughout the growth cycle of *Caladium bicolor*, from flowering to dormancy stage, representing five months of physiological development of the plant. The application of organic products to cultivation of *Caladium bicolor*, had a positive effect on the concentration of starch in tuber as reported by Ewing and Wareing (1978) and Hartmann and Kester (1999).

To determine the concentration of starch and protein in tubers of *Caladium bicolor*, calibration curves were built for starch and the following model was obtained: $y = 0.3063x - 0.0894$ with R^2 of 0.9822 (Figure 1). Similarly when plotting soluble protein curve and adding a trend line was obtained the following model: $y = 0.5351x + 0.0052$ with $R^2 = 0.9912$ (Figure 2). After obtaining the mathematical models, these equations were used to determine the concentration of starch and soluble proteins (y) in function of the readings obtained from the spectrophotometer with regard to applied doses (x).

fisiológico de la planta. La aplicación de productos orgánicos al cultivo de *Caladium bicolor*, presentó un efecto positivo en la concentración de almidón en tubérculo de acuerdo a lo reportado por Ewing y Wareing (1978) y Hartmann y Kester (1999).

Para determinar la concentración de almidón y proteínas en los tubérculos de *Caladium bicolor*, se realizaron curvas de calibración para almidón y se obtuvo el modelo: $y = 0.3063x - 0.0894$ con un R^2 de 0.9822 (Figura 1). De igual manera al graficar la curva de proteínas solubles y agregar la línea de tendencia se obtuvo el siguiente modelo: $y = 0.5351x + 0.0052$ con $R^2 = 0.9912$ (Figura 2). Después de obtener los modelos matemáticos se utilizaron estas ecuaciones para determinar la concentración de almidón y proteínas solubles (y) en función de lecturas obtenidas del espectrofotómetro con respecto a las dosis aplicadas (x).

En base a los modelos generados, se determinó la concentración de almidón y proteínas solubles en función a los tratamientos planteados, donde se obtuvieron los siguientes resultados.

El análisis de varianza mostró diferencia estadística altamente significativa para la concentración de almidón y proteínas solubles en tubérculo, en el modelo general ($Pr > F = 0.0001$) para ambos casos; con un R^2 de 0.974 y un coeficiente de variación de 10.95 para el caso de almidón y para proteínas solubles 0.8294 y 6.10 respectivamente. El análisis estadístico para el almidón y las proteínas solubles (Cuadro 2), mostró diferencia estadística entre tratamientos (dosis de productos orgánicos), etapa vegetativa (floración, pre dormancia y dormancia) y la interacción entre éstos.

Cuadro 2. Diferencia estadística e interacción entre factores y niveles.

Table 2. Statistical difference and interaction between factors and levels.

Variable independiente	Producto orgánico (PO)	Etapa vegetativa (EV)	Interacción PO*EV
Almidón	0.0001 **	0.0001 **	0.0002 **
Proteína	0.0002**	0.0352 *	0.0001 **

**diferencias altamente significativa; *diferencias significativas.

En el cuadro anterior se observa que al menos un tratamiento en una etapa vegetativa es diferente a los demás, tanto para almidón como para proteínas solubles; en base a estos resultados, se realizó la prueba de medias con LSD ($\alpha = 0.05$) las cuales se describen a continuación.

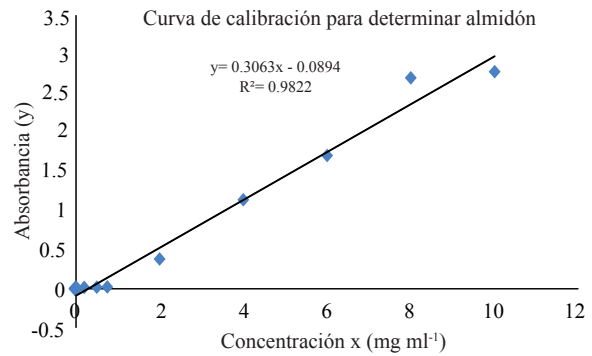


Figura 1. Curva de calibración para determinar concentraciones de almidón (mg g⁻¹ de MS) en tubérculos de *Caladium bicolor*.

Figure 1. Calibration curve to determine the concentration of starch (mg g⁻¹ of DM) in tubers of *Caladium bicolor*.

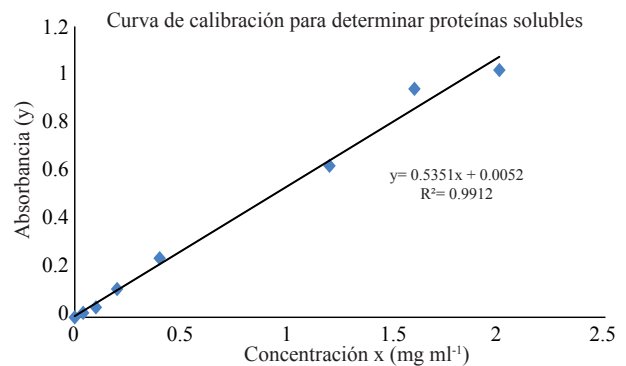


Figura 2. Curva de calibración para determinar concentraciones de proteínas solubles (mg g⁻¹ de MS) en tubérculos de *Caladium bicolor*.

Figure 2. Calibration curve to determine the concentration of soluble proteins (mg g⁻¹ of DM) in tubers of *Caladium bicolor*.

Based on the generated models, the concentration of starch and soluble proteins was determined according to treatment considerations, where the following results were obtained.

The analysis of variance showed highly significant statistical difference for the concentration of starch and soluble proteins in tuber, on the overall model ($Pr > F = 0.0001$) for both cases; with an R^2 of 0.974 and a coefficient of variation of 10.95 for starch and for soluble proteins

En el Cuadro 3, se muestra el comportamiento de las concentraciones de almidón en cada interacción (PO*EV). Los tratamientos con dosis de 4 y 8 ml L⁻¹ en la etapa de dormancia resultaron estadísticamente iguales, siendo la dosis de 8 ml L⁻¹ el de mayor concentración de almidón con 885.18 mg gr⁻¹ de materia seca (MS), seguido por el tratamiento testigo. En la etapa de pre-dormancia y 8 ml L⁻¹ en pre-dormancia, continuando con el tratamiento 4 ml L⁻¹ en etapa de floración y etapa de pre-dormancia, testigo en etapa de pre-dormancia siendo estadísticamente igual al de 8 ml L⁻¹ en floración y siendo el de más baja concentración y diferente a los tratamientos anteriores el tratamiento testigo en floración. El testigo siempre mostró valores bajos con respecto a los tratamientos donde se aplicaron las dosis de productos orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos).

Cuadro 3. Cantidad de almidón (mg g⁻¹ de MS) en tubérculo de *Caladium bicolor*.

Table 3. Amount of starch (mg g⁻¹ DM) in tuber of *Caladium bicolor*.

Dosis de producto orgánico	Etapas fenológicas	Media	
8 ml L ⁻¹	Dormancia	885.18	a
4 ml L ⁻¹	Dormancia	833.97	a
Testigo	Dormancia	634.62	b
8 ml L ⁻¹	Pre- dormancia	576.48	b
4 ml L ⁻¹	Floración	397.61	c
4 ml L ⁻¹	Pre- dormancia	330.98	cd
8 ml L ⁻¹	Floración	267.62	d
Testigo	Pre- dormancia	250.62	d
Testigo	Floración	80.2	e

Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales a un nivel de significancia de LSD ($\alpha=0.05$).

En la etapa de dormancia aumentaron considerablemente las cantidades de almidón, ya que como todo órgano de almacenamiento de reservas que se utilice para la propagación vegetal, los tubérculos de *Caladium bicolor* requieren de un periodo de acomodación y regulación fisiológica denominado dormancia, para lograr activarse nuevamente y así generar nuevos brotes para continuar con la sobrevivencia de la especie. Cuando la planta emerge, el crecimiento de la parte aérea y el de la raíz es sincronizado, dos a cuatro semanas después de la emergencia inicia el crecimiento de los tubérculos y continúa durante un largo periodo asociándose un retraso en el crecimiento de los tubérculos con un crecimiento excesivo de la biomasa aérea (Alonso, 2002).

En la etapa de pre-dormancia y floración, el tratamiento con dosis de 4 ml L⁻¹; presentó un descenso en la concentración de almidón en tubérculo, debido a que en esta etapa mostró mayor área foliar con respecto al de 8 ml L⁻¹; mayor área

0.8294 and 6.10 respectively. Statistical analysis for starch and soluble proteins (Table 2) showed statistical difference between treatments (dose of organic products), vegetative stage (flowering, predormancy and dormancy) and the interaction between them.

The above table shows that at least one treatment in a vegetative stage is different from the rest, both starch and soluble proteins; based on these results, mean test was performed with LSD ($\alpha=0.05$) which are described below.

Table 3, shows the behavior of the concentration of starch in each interaction (PO * EV). Treatments with doses of 4 and 8 ml L⁻¹ at dormancy were statistically equal, being the dose of 8 ml L⁻¹ the highest concentration of starch with 885.18 mg g⁻¹

dry matter (DM), followed by the control treatment. In predormancy and 8 ml L⁻¹ in predormancy, continuing treatment 4 ml L⁻¹ at flowering and pre-dormancy, control in predormancy being statistically equal to 8 ml L⁻¹ at flowering and being the lowest concentration and different to previous treatments the control treatment at flowering. Control always showed lower values compared to the treatments where the doses of organic products (humic and fulvic acids) were applied.

At dormancy the amounts of starch increased significantly, as every organ of reserve storage that is used for plant propagation, tubers of *Caladium bicolor* require a period of accommodation and physiological regulation called dormancy, to achieve activation again and generate new shoots to continue the survival of the species. When the plant emerges, the growth of the aerial part and root is synchronized, two to four weeks after emergence tubers

foliar significa mayor actividad en intercambio de gases con la atmósfera y por lo tanto el almidón se transportó a las hojas y raíces dejando por último el tubérculo, tal como lo menciona Villalobos (2001) en su investigación. Villacrés y Espín (1999) reportaron que el cultivo de papa contiene 82% de almidón y el cultivo de zanahoria 86% el cual se asemeja al tubérculo de *Caladium bicolor* ya que en la etapa de dormancia los tratamientos 8 y 4 ml L⁻¹ obtuvieron 88.5% y 83.3% respectivamente.

La concentración más alta de proteínas en tubérculo de *Caladium bicolor*, se observó en la etapa de floración y la más baja en la etapa de dormancia. En el caso de la concentración de almidón la respuesta fue de manera inversa. En el Cuadro 4 se observa igualdad estadística entre las dosis de 4 y 8 ml L⁻¹ en la etapa de floración y dosis de 8 ml L⁻¹ en la etapa de pre-dormancia, siendo éste último igual al tratamiento testigo en floración y al tratamiento con la dosis de 4 ml L⁻¹ en pre-dormancia, mostrando igualdad entre los tratamientos de 8 ml L⁻¹, 4 ml L⁻¹ en etapa de dormancia y testigo en la etapa de pre-dormancia; testigo en etapa de floración estadísticamente fue diferente a los tratamientos anteriores obteniendo la menor concentración.

Cuadro 4. Cantidad de proteína (mg g⁻¹ de MS) en tubérculo de *Caladium bicolor*.
Table 4. Amount of protein (mg g⁻¹ DM) in tuber of *Caladium bicolor*.

Dosis de producto orgánico	Etapa fenológica	Media	
4 ml L ⁻¹	Floración	156.043	a
8 ml L ⁻¹	Floración	150.547	a
8 ml L ⁻¹	Pre- dormancia	143.053	ab
Testigo	Dormancia	131.713	bc
4ml L ⁻¹	Pre- dormancia	129.48	bc
8 ml L ⁻¹	Dormancia	125.283	c
4 ml L ⁻¹	Dormancia	123.68	c
Testigo	Pre- dormancia	122.96	c
Testigo	Floración	106.507	d

Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales a un nivel de significancia de LSD ($\alpha=0.05$).

Los tratamientos con dosis de 4 y 8 ml L⁻¹ mostraron mayor concentración de proteína en la etapa de floración, debido que la planta presentó mayor número de hojas lo que se traduce a una mayor actividad fotosintética y por lo tanto mayor producción de proteínas, en comparación a la etapa de dormancia cuando el tubérculo ya no cuenta con hojas. Espín *et al.* (2001) reportaron que cultivos tuberosos como zanahoria y jícama contienen 5.15 y 5.64% de proteínas los cuales son superados por estos tratamientos ya que el rango que muestra el tubérculo de *Caladium bicolor* es de 10.6 a 15.6% de proteína.

growth initiate and continues for a long period associating a delay in the growth of tubers with excessive growth of aboveground biomass (Alonso, 2002).

At pre-dormancy and flowering, the treatment with doses of 4 ml L⁻¹; showed a decrease in the concentration of starch in the tuber, due to at this stage showed greater leaf area compared to that of 8 ml L⁻¹; greater leaf area means higher activity in gas exchange with the atmosphere and therefore the starch is transported to the leaves and roots leaving at last the tuber, as Villalobos (2001) mentions in his research. Villacrés and Espin (1999) reported that the potato contains 82% starch and carrot 86%, which resembles to tuber of *Caladium bicolor* since in dormancy the treatments 8 and 4 ml L⁻¹ obtained 88.5% and 83.3% respectively.

The highest concentration of protein in tuber of *Caladium bicolor* was observed at flowering and the lowest at dormancy. For concentration of starch the response was inversely. Table 4 shows statistical equality between doses of 4 and 8 ml L⁻¹ at flowering and dose of 8 ml L⁻¹ at predormancy, the latter being equal to the control treatment at flowering and to treatment with dose of 4 ml L⁻¹ at

predormancy showing equality between treatments of 8 ml L⁻¹, 4ml L⁻¹ at dormancy and control at predormancy; control at flowering was statistically different from previous treatments obtaining the lowest concentration.

Treatments with doses 4 and 8 ml L⁻¹ showed higher protein concentration at flowering stage due to the plant showed a higher number of leaves which translates to increased photosynthetic activity and thus increased production of proteins, compared to dormancy stage when the tuber no longer has leaves. Espín *et al.* (2001) reported that tuberous

La fertilización no solo influye en el rendimiento sino también en la calidad del tubérculo; se ha encontrado que el contenido de almidón del tubérculo depende del porcentaje y densidad de la materia seca así como del porcentaje del aire en tejidos (Talbert y Smith, 1967 citado por Sifuentes *et al.*, 2013), pero disminuye al aumentar los niveles de NPK ya que éstos elementos son los que determinan el contenido y la calidad del tubérculo (Kunkel y Holstad, 1972). Ante el incremento acelerado de los precios de los fertilizantes, la presencia de sequía recurrente, bajo grado de aprovechamiento de fertilizantes, contaminación de agua superficial y subterránea por fertilizantes nitrogenados y fosfóricos (Ierna *et al.*, 2011) así como el incremento en la variabilidad climática, es imperante el manejo de la fertilización del cultivo y el aprovechamiento de los productos orgánicos.

Conclusiones

La fertilización orgánica en el cultivo de *Caladium bicolor*, influye de manera positiva en la concentración de almidón y proteínas en el tubérculo en las diferentes etapas fisiológicas. La óptima aclimatación de la planta a condiciones adversas, depende en gran parte a las reservas vegetativas del cultivo, ya que a una mayor concentración de estas se traduce en un mayor número de plantas y por ende a un mayor rendimiento.

El presente experimento servirá de antecedente para seguir generando conocimiento científico y tecnológico sobre el manejo de este cultivo, mediante la manipulación de diferentes tratamientos y la medición de otras variables importantes en el desarrollo vegetativo. La reproducción y comercialización de especies ornamentales en la región tiende a ser una excelente alternativa para mejorar el ecosistema urbano, mejorando la calidad de vida de los ciudadanos y de los productores de éste tipo de plantas.

Literatura citada

- Aganga, A. A. and Tshwenyane, S. O. 2003. Lucerne, lablab and Leucaena leucocephala forages: Production and utilization for livestock production. *Pakistan J. Nutrit.* 2:46-53.
- Alonso, A. F. 2002. El cultivo de la patata. 2ª (Ed.). Editorial Mundi-Prensa. Barcelona. 494 p.
- Álvarez, R. A.; Goulet, P. and Garrido, J. 2004. Characterization of the porous structure of different humic fractions. *Colloids and surface.* 129-135 pp.

crops such as carrots and jicama that contain 5.15 and 5.64% of protein respectively which are exceeded by these treatments since the range that the tuber of *Caladium bicolor* show is 10.6 to 15.6% of protein.

Fertilization not only affects yield but also tuber quality; it has been found that starch content of the tuber depends on the percentage and density of dry matter as well as the percentage of air in tissues (Talbert and Smith, 1967 cited by Sifuentes *et al.*, 2013), but decreases with increasing levels of NPK since these elements are those determining the content and quality of the tuber (Kunkel and Holstad, 1972). Given the accelerated increase in fertilizer prices, the presence of recurrent drought, low degree of fertilizer utilization, pollution of surface and groundwater water by nitrate and phosphate fertilizers (Ierna *et al.*, 2011) and the increase in climate variability, it is imperative to manage crop fertilization and utilization of organic products.

Conclusions

Organic fertilization in the cultivation of *Caladium bicolor* has a positive influence on the concentration of starch and protein in the tuber in different physiological stages. The optimal plant acclimation to adverse conditions depends largely on vegetative reserves from the crop, since higher concentrations of these translate in a larger number of plants and hence higher yield.

This experiment will serve as background to continue to generate scientific and technological knowledge on the management of the crop, through manipulation of different treatments and measurement of other important variables in vegetative development. The reproduction and marketing of ornamental species in the region tends to be an excellent alternative to improve urban ecosystem, improving the quality of life of citizens and producers of this type of plant.

End of the English version



- Baguma, Y.; Sun, Ch.; Ahlandsberg, S.; Mutisya, J.; Palmqvist, S.; Rubaihayo, P.; Magambo, M.; Egwang, T.; Larsson, H. and Jansson, C. 2003. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Sci.* 164:833-839.

- Brigante, M.; Zanini, G. y Avena, M. 2006. Efecto de ácidos carboxílicos en la cinética de disolución de ácidos húmicos. Sección E. Química de sólidos, superficies, interfaces y materiales. Bahía Blanca, Argentina. 1 p.
- Espín, S.; Brito, B.; Villacrés, E.; Rubio, A.; Nieto, C. y Grijalva, J. 2001. Composición química, valor nutricional y usos potenciales de siete especies de raíces y tubérculos andinos. Acta Científica Ecuatoriana. Ambato, Ecuador. 7(1):49.
- Evans, M. R.; Harbaugh, B. K.; Wilfret, G. J. 1993. Caladiums as potted and landscape plants. Circular 1060. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 9 p.
- Ewing, E. E. and Wareing, P. F. 1978. Shoot, stolon and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. Plant Physiol. 61:348-353.
- Hartmann, H. and Kester, D. 1999. Propagación de plantas. Principios y práctica. Séptima edición, México, D. F. 532-534 pp.
- Ierna, A.; Pandino, G.; Lombardo, S. and Mauromicale, G. 2011. Tuber yield, water and fertilizer productivity in early potato as affected by a combination of irrigation and fertilization. Agric. Water Manag. 101:35-41.
- Kosłowski, T. T. and Pallardy, S. G. 1997. Physiology of woody plants. Academic Press. New York, N.Y. 411 p.
- Kunkel, R. and Holstad, N. 1972. Potato chip color, specific gravity and fertilization of potato with N-P-K. Am J. Potato Res. 49:43-62.
- López, S. R. 2009. Comportamiento de tres ácidos fúlvicos en la nutrición y distribución de raíz del chile piquín y naranjo. Tesis de Maestría en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León, Linares, Nuevo León, México.
- Mayol, M.; Bogner J. and Boyce, P. C. 1997. The genera of araceae I-XII. Royal Botanic Gardens, Kew. 370 p.
- O’Kennedy, B. T. and Titus, J. S. 1979. Isolation and mobilisation of storage proteins from apple shoot bark. Physiol. Plant. 45. 419-424 pp.
- Péret, B.; De Rybel, B.; Casimiro, I.; Benkova, I.; Swarup, R.; Laplaze, L.; Beeckman, T. and Bennett, M. J. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. Trends Plant Sci. 14:399-408.
- Potisek, T. M. C.; González, C. G.; Velásquez, V. M. y Macías, R. H. 2013. Efecto del ácido fúlvico en la extracción nutrimental y rendimiento del cultivo de melón en bioespacio. AGROFAZ. 13(2):23-29.
- Sauter, J. J.; Van Cleve, B. and Apel, K. 1990. Protein bodies in ray cells of *Populus x Canadensis* Moench ‘robusta’. Planta. 173:31-34.
- Scott, G.; Rosegrant, M. y Ringler, C. 2000. Tendencias y proyecciones para los cultivos de raíces y tubérculos para el año 2020. Alimentos, Agricultura y Medio Ambiente. Documento de discusión IFPRI-CIP. Washington, DC.
- Shah, M.; Mateen, A. and Amin, N. 2007. Effect of various amended organic media on the tuberization of caladium cultivars. Department of Horticulture. Faculty of Crop Production Sciences, NWFP Agricultural University, Peshawar Sarhad. J. Agric. 23-4.
- Sifuentes, E.; Ojeda, W.; Mendoza, C.; Macías, J.; Rúelas, J. e Inzunza, M. 2013. Nutrición del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) considerando variabilidad climática en el “Valle del Fuerte” Sinaloa, México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 4(4):585-597.
- Staswick, P. E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissue. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45:303-322.
- Statistical Analysis System (SAS). 1998. Institute. SAS for Windows. Release 6-12, version 4.0.1111. SAS Compus Drive. North Carolina. USA.
- Stepien, V. and Martin, F. 1994. Purification, characterization and localization of the bark storage proteins of poplar. Plant Physiol. Biochem. 30:399-407.
- Talburt, W. and Smith, O. 1967. Potato processing. 4th (Ed.). AVI Publishing Company, California. 588.
- Tester, R.; Karkalas, J. and Qi, X. 2004. Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship. World’s Poul Sci J. 60:186-196.
- Valenzuela, L. M.; Gérant, D.; Maillard, P.; Bréda, N.; González, G. y Sánchez, I. 2011. Evidence for 26kDA vegetative storage protein in the stem sapwood of mature pedunculate oak. Interciencia. 36(2):142-147.
- Villacrés, E. y Espín, S. 1999. Evaluación y rendimiento, características y propiedades del almidón de algunas raíces y tubérculos andinos. In: raíces y tubérculos andinos. Avances de la investigación Tomo 1. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 25-35 pp.
- Villalobos, E. 2001. Fisiología de la producción de los productos tropicales. EUCR. San José, Costa Rica. 228 p.
- Viser, S. A. 1986. Effect of humic substances on plant growth. In: Burns, R. (Eds.). Humic substances, effects on soil and plants. Reda Ramo Editoriale degli agricoltori. Milan, Italia.