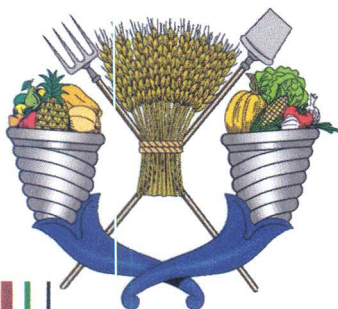




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS EN
DIFERENTES CULTIVARES DE NOCHEBUENA**

(*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzch)

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA

HUMBERTO VILLEGAS RODRÍGUEZ

**Chapingo, México
Marzo de 2006**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

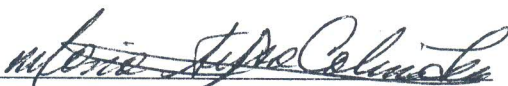


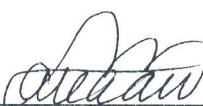
**DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS EN DIFERENTES CULTIVARES DE
NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch.)**

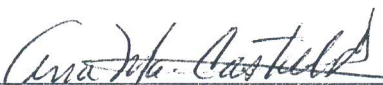
Esta tesis fue realizada por Humberto Villegas Rodríguez, bajo la dirección y asesoría del Comité Asesor que se indica; ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

COMITÉ ASESOR


Ph. D. María Teresa Colinas León
Presidenta


Ph. D. Jaime Sahagún Castellanos
Asesor

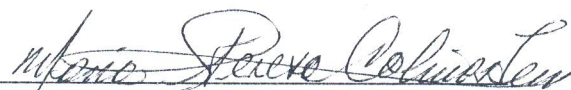

Dra. Ana María Castillo González
Asesora

DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS EN DIFERENTES CULTIVARES DE NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch.)

Esta tesis fue realizada por Humberto Villegas Rodríguez, bajo la dirección y asesoría del Comité Asesor que se indica; ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

COMITÉ ASESOR



Ph. D. María Teresa Beryl Colinas León
Presidenta



Ph. D. Jaime Sahagún Castellanos
Asesor

Dra. Ana María Castillo González
Asesora



M.C. José Merced Mejía Muñoz
Asesor

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor del presente trabajo de tesis es Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia, egresado de la Universidad Autónoma Chapingo. Es originario de Tecamachalco, Puebla. Pertenece a la generación 1986-1991. Sus estudios profesionales estuvieron enfocados hacia la Floricultura, área en la cual ha realizado diversas investigaciones y dirigido más de 50 tesis de Licenciatura. Su trabajo se ha destacado por su vinculación con los productores, con los que ha organizado varios cursos de capacitación, enfocando su investigación hacia la resolución de problemas en campo. Es Profesor de la Academia de Floricultura de la especialidad de Fitotecnia desde 1993. Inició sus estudios de maestría en el año 2000.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi Alma Mater, por darme la oportunidad de seguirme formando como profesionista al realizar mis estudios de maestría.

Al Departamento de Fitotecnia y en especial al Instituto de Horticultura Ornamental por la formación académica que me brindó durante estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo financiero para mi formación como investigador y tener un conocimiento mas apropiado en el cultivo de nochebuena.

A mi comité asesor: Dra. María Teresa Colinas León, Dr. Jaime Sahagún Castellanos, Dra. Ana María Castillo González y M.C. José M. Mejía Muñoz, mis agradecimientos por su apoyo y confianza para la realización de la tesis y por sus acertadas sugerencias en la investigación.

Al Dr. Eliseo Sosa Montes profesor investigador del Departamento de Zootecnia y a la M.C. Nancy Lobato por el apoyo brindado en el análisis de las antocianinas.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco por su apoyo en la conclusión de la presente investigación.

DEDICATORIA

A DIOS trino porque El me conoce mucho antes de que yo naciera , porque El es la Verdad y el Camino y porque Él tiene un propósito para mi vida.

A mis padres Guadalupe Rodríguez Valladares y Feliciano Villegas Silva, con todo cariño y respeto por ser un gran ejemplo de amor y enseñanza en mi matrimonio.

A mi suegra Alfonsina Chit Navarrete con gran respeto por su constancia y voluntad de superación personal.

A mi esposa Erendira Carmona Chit por todo su gran amor, apoyo y por el gran valor que ella le ha dado a mi vida.

A mis hijas Mitzi, Paola, y Laura por ser la inspiración en mis jornadas de trabajo, alegría, y superación.

A mis hermanos por su cariño y confianza y sobre todo por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis cuñados (as), sobrinos (as) con cariño y respeto por su convivencia familiar.

IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS EN BRÁCTEAS DE CINCO CULTIVARES DE NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzch)

PIGMENT IDENTIFICATION IN FIVE *Euphorbia pulcherrima* (Willd. ex Klotzch) CROPS

Humberto Villegas Rodríguez¹, Teresa Colinas León².

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue comparar la respuesta de crecimiento de cuatro variedades comerciales de nochebuena Supjibi roja, Marble Star, Silver Star y V-17 'Angelika'; así como comparar el contenido de clorofila en hojas y de pigmentos en brácteas de cinco cultivares: Supjibi roja, Freedom roja, Supjibi rosa, Silver Star y V-17 (Angelika). En el análisis de crecimiento se determinaron el número, longitud y diámetro basal de brotes, así como el número de hojas por brote. Se determinó el contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total por medio de la absorbancia a 645 y 663 nm. La determinación del contenido de antocianinas se efectuó en las brácteas y hojas de transición. La extracción de los pigmentos se llevó a cabo en tres extracciones sucesivas, a partir de 5 g de la muestra, mediante la técnica de HPLC en fase reversa. 'Supjibi' y 'Angelika' presentaron la mejor respuesta de crecimiento en longitud, diámetro y número de hojas por brote. Los cultivares con mayor contenido de clorofila (a, b y clorofilas totales) fueron Supjibi y el cultivar V-17. Se detectó un total de 10 antocianinas en *E. pulcherrima*, excepto en la variedad blanca, donde las antocianinas estuvieron ausentes. La cianidina, pelargonidina y malvidina están presentes en todas las variedades. De las siete antocianinas restantes se desconoce el nombre. Los cultivares rojos presentan hasta 9 tipos de antocianinas, siendo A y B exclusivas de Supjibi. Los cuatro pigmentos con mayor concentración fueron: B, cianidina, C y pelargonidina, excepto en el cultivar blanco. La concentración de cianidina fue mayor en comparación a las de pelargonidina y malvidina. La pelargonidina ocupa el segundo lugar en concentración en los cultivares rojos. Las brácteas y hojas de transición de Supjibi y Freedom presentaron una proporción de casi 3:1 de cianidina: pelargonidina. La malvidina, se encuentra presente sólo en cultivares rojos (Supjibi y Freedom), así como en las brácteas de Supjibi rosa (menos de 1 % del total).

ABSTRACT

This research was made in order to compare growth response of four commercial poinsettias cultivars: Supjibi red, Marble Star, Silver Star and V-17 'Angelika'; as well as to determine chlorophylls and anthocyanins content in bracts of five poinsettia varieties: red Supjibi, red Freedom, pink Supjibi, Silver Star, and White V-17 'Angelika'. In growth analysis number, length and basal diameter of buds were determined as well as Chlorophyll a, b and total contents were determined by means of spectrophotometer at 645 and 663 nm. Anthocyanin contents were determined in bracts and transition leaves. Pigment extractions were made three successive times from 5 g samples by means of HPLC in the reverse phase. The varieties with a higher chlorophyll content (a, b and total) were Supjibi and White V-17. 'Supjibi' and 'Angelika' showed the best growing response in length, diameter and number of leaves per bud. Major chlorophyll contents were founded in 'Supjibi' and 'V-17'. A total of 10 anthocyanins were detected in *E. pulcherrima*, with the exception of the white variety in which anthocyanins were absent. Cyanidin, pelargonidin and malvidin were present in all varieties. The names of the remaining anthocyanins are unknown. Red varieties showed up to 9 types of anthocyanins, with A and D found exclusively in the Supjibi variety. The four pigments with major concentration were, except in the white variety: B, cyanidin, C and pelargonidin. Cyanidin concentration was higher than pelargonidin and malvidin contents. Pelargonidin was second in concentration in the red varieties. Bracts and transition leaves in Supjibi and Freedom varieties, which showed a proportion of nearly 3:1 of cyanidin: pelargonidin. Malvidin was found only in the red varieties (Supjibi and Freedom), as well as in pink Supjibi bracts (in concentrations of less than 1% of the total).

Palabras clave: Nochebuenas, antocianinas, pigmentación roja

Key words: Poinsettias, anthocyanins, red pigmentation.

1: Tesista

2: director de tesis

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1 Generalidades sobre el cultivo de nochebuena.....	3
3.1.1 Historia del cultivo.....	3
3.1.2 Clasificación y descripción botánica.....	4
3.1.3 Floración.....	5
3.2 Requerimiento del cultivo	6
3.2.1 Sustrato.....	6
3.2.2 Calidad del agua de riego.....	6
3.2.3 Fertilización.....	6
3.3 Requerimientos climáticos	7
3.3.1 Luz.....	7
3.3.1.1 Intensidad luminosa.....	7
3.3.1.2 Espectro de radiación.....	7
3.3.1. Fotoperíodo.....	7
3.3.2 Horas oscuridad en Texcoco, Estado de México.....	10
3.3.3 Temperatura.....	10
3.3.3.2 Diferencial de temperaturas.....	14
3.4 Fitocromo.....	15
3.4.1 Acción fundamental.....	15
3.4.2 Localización del fitocromo.....	16
3.4.3 Formas del fitocromo en la planta.....	17
3.4.4 Mecanismos de acción del fitocromo.....	17
3.5 Variedades de nochebuena cultivados en México.....	18
3.5.1 Características de las variedades.....	18
3.6 Procesos de pigmentación en flores.....	23
3.6.1 Clorofila.....	23
3.6.2 Constituyentes del color.....	23
3.6.2. Flavonoides.....	23
3.6.2.2 Síntesis bioquímica de flavonoides.....	24
3.6.2.3 Síntesis de antocianinas.....	25
3.7 Antecedentes de pigmentación en <i>Euphorbia pulcherrima</i>	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33

4.1 Material Vegetal.....	33
4.2 Ubicación del experimento.....	33
4.3 Manejo del cultivo.....	33
4.3.1 Preparación del sustrato y llenado de macetas	33
4.3.2 Plantación.....	33
4.3.3 Sobre enmacetado.....	34
4.3.4 Sombreo	34
4.3.5 Poda (pinchado).....	34
4.3.6 Fotoperíodo (tratamiento de oscuridad).....	34
4.3.7 Riegos.....	34
4.3.8 Control de plagas y enfermedades.....	35
4.3.9 Espaciamientos y fertilización.....	35
4.4 Diseño experimental.....	35
4.5 Determinaciones de crecimiento vegetativo.....	36
4.5.2 Longitud de brotes.....	36
4.5.3 Diámetro basal de brotes.....	36
4.5.4 Número de hojas por brotes.....	36
4.6 Cuantificación de pigmentos.....	36
4.6.1 Contenido de clorofila.....	36
4.6.2 Contenido de antocianinas totales.....	37
4.6.2.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	38
4.6.2.2 Purificación de las muestras para el análisis de antocianinas por HPLC.....	38
4.6.2.3 Extracción de antocianinas para HPLC.....	40
4.6.2.4 Identificación de antocianinas.....	41
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
5.1 Variables de crecimiento.....	42
5.1.1 Longitud de brotes.....	42
5.1.2 Diámetro basal de brotes.....	43
5.1.3 Número de hojas.....	44
5.2 Cuantificación de pigmentos.....	46
5.2.1 Contenido de clorofila.....	46
5.2.2 Contenido e identificación de antocianinas por HPLC en brácteas y hojas de transición.....	46
VI. CONCLUSIONES.....	58
VII. RECOMENDACIONES.....	59
VIII. LITERATURA CITADA.....	60
IX. ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Requerimientos de calidad de agua para el riego de nochebuena.....	6
Cuadro 2. Principales antocianinas y sus sustituyentes en la molécula de pelargonidina.....	26
Cuadro 3. Fórmula empleada para la fertilización en maceta.....	35
Cuadro 4. Sistema de gradientes empleado en el análisis de antocianinas por HPLC.....	39
Cuadro 5. Absorbancia registrada por la pelargonidina clorada para la construcción del estándar.....	39
Cuadro 6. Contenido promedio de clorofila en cuatro cultivares de nochebuena.....	46
Cuadro 7. Descripción del Cromatograma para antocianinas estándar (Pelargonidina, Cianidina, Malvidina).....	47
Cuadro 8. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de ‘Supjibi Roja’	48
Cuadro 9. Descripción del cromatograma para antocianinas en hojas de transición de ‘Supjibi Roja’	49
Cuadro 10. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de ‘Supjibi Rosa’	50
Cuadro 11. Descripción del cromatograma para antocianinas en hojas de transición de ‘Supjibi Rosa’	50
Cuadro 12. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de ‘Freedom’	51
Cuadro 13. Descripción del cromatograma para antocianinas en hojas de transición de ‘Freedom’	52
Cuadro 14. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de ‘Silver Star’	53
Cuadro 15. Descripción del cromatograma para antocianinas en hojas de transición de ‘Silver Star’	53
Cuadro 16. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas y hojas de transición de ‘V-17 Angelika’.	54
Cuadro 17. Contenido de antocianinas detectadas por variedad.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura molecular de la pelargonina y pelargonidina.....	26
Figura 2. Estructura molecular de las tres principales antocianinas en flores.....	26
Figura 3. Curva estándar obtenida a partir de la pelargonidina clorada.....	39
Figura 4. Longitud de brotes en cuatro variedades de nochebuena en Texcoco, México.....	42
Figura 5. Diámetro basal de brote en cuatro variedades de cochebuena en Texcoco, México.....	44
Figura 6. Número de hojas por brote en cuatro variedades de nochebuena en Texcoco, México.....	45
Figura 7. Cromatograma de antocianinas estándar (Cianidina, Pelargonidina y Malvidina).....	47
Figura 8. Cromatograma de antocianinas en brácteas de ‘Supjibi Roja’.....	47
Figura 9. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de ‘Supjibi Roja’.....	48
Figura 10. Cromatograma de antocianinas en brácteas de ‘Supjibi Rosa’.....	49
Figura 11. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de ‘Supjibi Rosa’.....	50
Figura 12. Cromatograma de antocianinas en brácteas de ‘Freedom’.....	51
Figura 13. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de ‘Freedom’.....	52
Figura 14. Cromatograma de antocianinas en brácteas de ‘Silver Star’.....	52
Figura 15. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de ‘Silver Star’.....	53

I. INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzch.) mostró un auge en la década de los setentas con la introducción de variedades mejoradas, y ha mostrado un gran incremento en los últimos años. En 1994 la producción nacional fue de alrededor de 2'500,000 plantas en sus diferentes presentaciones. En 2002 se estimó una producción de 8.5 millones de plantas (PLANTEC com. pers.).

Por lo general la mayoría de los productores, sobre todo los que se inician en la producción de plantas de nochebuena, desconocen los factores que influyen en el proceso inductivo a floración y pigmentación de brácteas. Aunque son varias las investigaciones realizadas sobre la pigmentación en *E. pulcherrima*, es escasa la información reciente sobre las características de pigmentación de las variedades cultivadas en México a escala comercial.

El mejor conocimiento de los factores que participan en el proceso de pigmentación de los cultivares comerciales en México contribuirá a elevar la calidad de los cultivos y a dirigir la producción hacia mejor satisfacción de la demanda del mercado.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

- Comparar el desarrollo de cuatro diferentes variedades comerciales de nochebuena en el área de Texcoco, México.
- Determinar el contenido de clorofila en las hojas de cinco variedades de nochebuena.
- Determinar los tipos y proporción de antocianinas y que intervienen en la coloración de las brácteas de cinco variedades de nochebuena.

Hipótesis

- Existen por lo menos tres tipos de antocianinas que intervienen en la pigmentación de las brácteas en nochebuena.
- El contenido y tipo de antocianinas en las brácteas de nochebuena dependen de la variedad.
- Los principales pigmentos en *E. pulcherrima* son la cianidina y la pelargonidina. La diferente coloración es debida a la diferente proporción de estos pigmentos.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades sobre el cultivo de nochebuena

3.1.1 Historia del cultivo

La nochebuena, *Euphorbia pulcherrima*, es también conocida como pascua, flor de Navidad, estrella de Navidad o poinsettia. Nativa de las áreas tropicales de México y Centroamérica (Guatemala) su origen se atribuye a la zona de Taxco, Guerrero en México (Medina, 1991). En la actualidad se puede encontrar en forma silvestre en la vertiente del Oeste de la Sierra Madre Occidental en los Estados de Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Saldaña, 1992).

Los aztecas la cultivaban antes de la llegada de los españoles y la llamaban “Cuetlaxochitl”, que en náhuatl significa “flor de piel” o “flor de cuero”, por la apariencia de las brácteas. Debido a su color brillante, para los aztecas la flor era símbolo de pureza. Sin embargo, también le daban usos prácticos a la planta, ya que extraían de las brácteas una tinta de color rojo púrpura y el látex lo usaban para preparar una medicina que contrarrestaba la fiebre (Saldaña, 1992).

Las plantas de nochebuena fueron introducidas por primera vez a Estados Unidos en 1825 por Joel Robert Poinsett. A partir de entonces creció su popularidad en Norteamérica hasta formar parte esencial de la tradición, lo que la ha convertido en la planta en maceta más cotizada. En Europa ha cobrado más importancia como planta en maceta desde principios de los 60's. (Grueber, 1985).

En zonas donde no cae nieve, la nochebuena es utilizada en arquitectura del paisaje, mientras que en zonas más hostiles es forzada a florecer bajo protección como planta tradicional navideña, en maceta para su venta o rara vez como flor de corte (Grueber, 1985).

3.1.2 Clasificación y descripción botánica

La nochebuena se ubica en la siguiente clasificación botánica (Rzedowski y Rzedowski, 1990):

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Geraniales
Familia	Euphorbiaceae
Género	<i>Euphorbia</i> L.
Especie	<i>pulcherrima</i> Willd. ex Klotzch

Las plantas de esta especie crecen hasta 3 m y florecen a mediados del invierno en su hábitat natural. La inflorescencia se compone generalmente de ramificaciones axilares. Los meristemas en las axilas de primer orden (primeras brácteas formadas) y en las axilas de las brácteas subsecuentemente formadas, se diferencian y elongan hasta llegar a los ciatios de segundo, tercero y cuarto orden en cada bráctea que la subtiende (Struckmeyer y Beck, 1970).

Las flores de este género se encuentran en las partes terminales y están formadas por un involucre caliciforme acompañado de 4-5 lóbulos enteros o lacerados y grandes glándulas enteras o provistas de dos cuernitos. Las flores masculinas están formadas por un sólo estambre, con el filamento articulado y la antera globosa con dehiscencia longitudinal. En el centro del ciatio se encuentra una flor femenina, formada por un gineceo saliente en la madurez, provista de un largo pedúnculo. El ovario es trilocular con tres estilos bífidos o indivisos, con un óvulo en cada lóculo. En *E. pulcherrima* los primeros ciatios forman sólo flores estaminadas. Los mismos ciatios pueden tener apéndices que en la poinsettia aparecen como nectarios amarillos en sus orillas. El fruto es una cápsula trilocular (Sánchez, 1979).

Las estructuras vistosas de las inflorescencias de nochebuena son las hojas petaloides pigmentadas de blanco, rosa, blanco-rosa o rojo (brácteas) que se forman paralelamente con el desarrollo del ciatio. En condiciones de noches largas el ápice vegetativo comienza la formación de un ciatio y termina el crecimiento del tallo. Los últimos entrenudos no se alargan y las tres hojas superiores se convierten en brácteas típicas. Una flor típica, bien desarrollada se compone de 22 ciatios y aproximadamente 27 brácteas (Struckmeyer y Beck, 1970).

3.1.3 Floración

Las nochebuenas se cultivan no por sus flores verdaderas sino por la coloración de sus brácteas. Para generar estas brácteas, sin embargo, primero deben ser inducidas y permitir que se desarrollen las partes florales (Grueber, 1985).

La inducción de botones florales depende de la longitud del día. La nochebuena se le clasifica como una planta de día corto (Struckmeyer y Beck, 1970). La inducción floral y el desarrollo vegetativo en general están regulados principalmente por el fotoperíodo con una fuerte interacción con la temperatura (Grueber, 1985).

La inducción a floración de la nochebuena se da cuando hay un período oscuro ininterrumpido de aproximadamente 12 horas o más, y otras condiciones apropiadas. Un período oscuro de 12 horas ocurre en condiciones naturales desde el 5 de octubre hasta el 10 de marzo en el hemisferio norte, donde se producen las nochebuenas (Islas Hawaianas y Ciudad de México en la latitud 20° N hasta el norte de Europa en la latitud 60° N). La fecha real de inducción floral en el otoño es modificada por la edad del brote que presenta la iniciación y la temperatura a la cual se somete el cultivo. Larson *et al.* (1978), establecieron para un cultivar indeterminado, que la longitud crítica del día estaba cerca de las 12.15 horas (mediados de septiembre) a 35° latitud N con temperaturas nocturnas de 21° C.

3.2 Requerimientos del cultivo

3.2.1 Sustrato

Las nochebuenas requieren de suelos con 50 a 70% de espacio poroso total, del cual por lo menos una tercera parte debe estar constituido por macroporos permitiendo el drenaje inmediatamente después del riego, llenándose de aire para un adecuado intercambio gaseoso de las raíces. La otra parte se encargará de retener el agua y los nutrientes disueltos (Martínez, 1995). El pH óptimo para el desarrollo del cultivo en un sustrato con suelo es de 6.3 a 6.8 y para un sustrato libre de suelo de 5.5 a 6.5 (Martínez, 1995).

3.2.2 Calidad del agua de riego

Se presentan en el siguiente cuadro las principales características de calidad de agua de riego en el cultivo de nochebuena.

Cuadro 1. Requerimientos de calidad de agua para el riego de nochebuena

FACTOR	EXCELENTE	BUENO	PERMISIBLE	DUDOSO	IMPROPIO
Conductividad eléctrica	0.25	0.25 – 0.75	0.75 – 2.0	2.0 – 3.0	> 3.0
Sales (ppm)	175	175 – 525	525 – 1400	1400–2100	>2100
Volumen de sodio (% de sales como Sodio)	20	20- 40	40 – 60	60 – 80	>80
SAR	3	3 – 5	5 – 10	10 – 15	>15
Acidez (pH)	6.5	6.5 – 6.8	6.8 – 7.0	7.0 – 8.0	>8.0

Fuente: Martínez, 1995.

3.2.3. Fertilización

En cada fertilización el cultivo necesita de 200 a 300 ppm de nitrógeno y potasio, de 50 a 100 ppm de fósforo, 80 a 120 de calcio, 40 a 60 ppm de zinc y 0.10 a .20 ppm de molibdeno. Es necesario que por lo menos el 60% del nitrógeno suministrado sea en forma de nitrato, no se recomienda aplicar urea (Martínez, 1995), así como sulfato de amonio, triple 17, cloruro de potasio, estiércol, superfosfato y cualquier fertilizante amoniacal (Carmichael, 1990).

3.3 Requerimientos climáticos

3.3.1 Luz

Martínez (1995) menciona que para un buen desarrollo de plantas de nochebuena, la luz debe presentar las siguientes características: intensidad (3,500 a 5,000 pies c andela) , color (toda la gama de colores de la radiación fotosintéticamente activa de la fotosíntesis: 400-700 nm) y fotoperíodos cortos (Martínez, 1995). Los altos niveles de radiación (6000 a 6500 pies/candela) son necesarios para el crecimiento óptimo y desarrollo de la coloración de brácteas e inducción de la formación del ciatio y la antesis. (Liu-bin *et al.*, 1998).

3.3.1.1 Intensidad luminosa

La intensidad luminosa afecta el color de las brácteas y las hojas, el alargamiento de los tallos y la retención del follaje. Una planta con demasiada luz sufre amarillamiento en el follaje, blanqueamiento de la flor, poco crecimiento y dureza de los tallos. Pueden aparecer también quemaduras de hojas. Poca luz causa crecimiento débil, alargamiento, retraso de floración y palidez en el tallo (Carmichael, 1990).

Generalmente las intensidades mínimas de luz que se necesitan para que los procesos morfogénéticos ocurran, son mucho más bajas que los mínimos necesarios para que se dé la fotosíntesis (Pérez y Martínez, 1994).

3.3.1.2 Espectro de radiación

Para un crecimiento óptimo las nochebuenas requieren de todo el rango de la radiación fotosintéticamente activa (luz natural que da el sol), que va de los 400 a los 700 nm.

Es importante usar color blanco o claro para dar sombra, y no pinturas de color. La composición espectral de la luz afecta la longitud de entrenudos y la síntesis de antocianinas (Pérez y Martínez, 1994).

3.3.1.3 Fotoperíodo

Las plantas, además de realizar el proceso de fotosíntesis presentan sistemas fotoquímicos capaces de percibir diferencias en la dirección, duración, irradiación y

calidad del espectro de luz, capaces también de activar procesos que generan cambios cualitativos y cuantitativos en el tipo de crecimiento y desarrollo de las plantas (Alpi y Togonif, 1987).

Aunque la longitud del fotoperíodo no tenga ninguna influencia sobre la iniciación de las flores, puede comprobarse que presenta una influencia de tipo cuantitativo. Al aumentar la longitud del fotoperíodo se obtiene un incremento del número de primordios florales. Mientras que la longitud del período de oscuridad determina la iniciación real de los primordios florales, la longitud del período de luz determina el número de primordios florales que se producirán (Devlin, 1990).

De acuerdo al fotoperiodismo, algunas especies vegetales para su floración se clasifican en (Mejía y Espinosa, 2003):

Plantas de día largo a floración. Son aquellas que requieren para florecer un fotoperíodo mayor de cierto número de horas al día (período crítico).

Plantas de día corto a floración. Requieren para florecer un fotoperíodo no mayor de cierto número de horas al día (período crítico).

Plantas indiferentes ó neutras. Florecen después de un cierto periodo de crecimiento vegetativo independiente del fotoperíodo (Pérez y Martínez, 1994).

Las nochebuenas son sensibles al fotoperíodo, iniciando la floración cuando el periodo de oscuridad es por lo menos 12.5 horas continuas (Martínez, 1995) ó 12.2 horas que ocurren entre septiembre y marzo en las latitudes de México; sin embargo, es posible inducir la floración en otros meses del año, cubriendo los invernaderos con plástico negro durante 14 horas (5 p.m. y 7 a.m.) (Carmichael, 1990).

Los extremos de los brotes más viejos aparentemente tienen más estímulos naturales de floración y pueden iniciar flores hasta 10 días antes (25 de septiembre) mientras que las plantas recientemente propagadas o despuntadas serán igualmente retardadas en la iniciación (Larson, 1988).

Martínez (1990), indica que no es necesario colocar plástico después del 10 de octubre, que la floración de las variedades comerciales se da de manera natural en latitudes de México. Maisano (1977 citado por Grueber, 1985) recomienda de 4 a 6 semanas de días cortos ininterrumpidos para la buena floración de nochebuena. Comercialmente se han empleado tres fotoperíodos para regular la floración en la nochebuena: los días naturales, la cubierta oscura y la fuga (Light out). Cada uno de estos métodos somete a las plantas a diferentes longitudes de noche (Wieland *et al.*, 2000).

Existe una relación directa entre la intensidad de la floración (medida por el número de ciatios y brácteas) y el número de días cortos que ha recibido la planta. Se necesitan al menos 60 días cortos para que aparezcan los ciatios de cuarto orden (Struckmeyer y Beck, 1970) y den lugar a una flor completa.

La longitud crítica del día para continuar el desarrollo floral es más corta que aquél de la iniciación floral. Con períodos de luz superiores a las 12 horas, Kofranek y Hackett (1965) encontraron que el desarrollo floral avanzaba lentamente o se inhibía aún cuando tales condiciones de fotoperíodo se habían dado previamente en la iniciación. La iniciación floral puede decaer para cosechas más tardías proporcionando cuatro horas de cualquier fuente de luz o con cerca de 100 lx de luz incandescente (Ecke y Matkin, 1976).

Las plantas mantenidas sólo por tres semanas bajo condiciones de días cortos fallaron en la producción de primordios florales o de hojas rojas (brácteas) en las siguientes cinco semanas cuando se transfirieron a condiciones de luz continua. Por ello Kannangara y Hansson (1998), concluyen que hay un desarrollo normal de las hojas jóvenes, que serán brácteas después, durante las tres primeras semanas bajo condiciones de días cortos.

La exposición de las hojas a un fotoperíodo apropiado puede dar lugar ya sea a la remoción de los inhibidores florales en las hojas o a la formación y/o liberación de estímulos en las hojas capaces de evocar la morfogénesis floral en los meristemas. Los primeros signos de formación de la inflorescencia roja en las plantas que se mantuvieron bajo condiciones de días cortos aparecieron después de cuatro semanas. Entre la cuarta

y quinta semana, las hojas más jóvenes comenzaron a acumular antocianinas y a tornarse rojas. En forma subsiguiente, los meristemos apicales se diferenciaron en primordios florales (Kannangara y Hansson, 1998).

Estos mismos autores concluyen que la acumulación de clorofila se detiene cuando las hojas de *E. pulcherrima* comienzan a acumular antocianinas bajo condiciones de días cortos. El cese de acumulación de clorofila al comienzo de la síntesis de antocianinas puede ser el resultado de la pérdida de uno o más de los componentes clave involucrados en la biosíntesis o puede deberse a una falla general en los componentes requeridos para la formación de cloroplastos. Los autores encontraron que hay un incremento gradual de las proteínas y la clorofila por unidad de área en las brácteas pigmentadas durante las primeras tres semanas de inducción y un declive en la quinta semana subsiguiente (Kannangara y Hansson, 1998).

3.3.2 Horas oscuridad en Texcoco, Estado de México.

En el Estado de México, en los meses de agosto y septiembre, cuando se establece el cultivo de nochebuena, se presentan menos de 12 horas oscuridad, por lo que se debe dar un tratamiento de oscuridad a partir de las 18:00 horas del día inicial hasta las 8:00 horas del día siguiente, durante un período de 21 días (ciclo inductivo) (Villegas, 1998).

3.3.3 Temperatura

La temperatura óptima para la iniciación floral varía con el cultivar pero la mayoría de los cultivares actuales inician sus flores rápidamente entre 15 y 20° C. La iniciación floral se retrasa a una temperatura más cálida en el fotoperíodo natural de otoño. Una iniciación floral satisfactoria se llevará a cabo a temperaturas nocturnas de hasta 18° C, asumiendo que el período oscuro es también más largo, como sería el caso con la tela negra, usada para producir un período de oscuridad de 15 horas diarias (Larson, 1988).

La influencia de la temperatura sobre el crecimiento reproductivo de las plantas está estrechamente relacionada con los efectos foto periódicos. Según la particular combinación de los ciclos de temperatura y de fotoperíodo, la influencia térmica puede reforzar la del fotoperíodo, promoviendo o inhibiendo el desarrollo reproductivo, o

actuando en contraposición a éste. En este último caso, puede predominar el efecto de la temperatura o del fotoperíodo, según la planta y otras condiciones (Mayer *et al.*, 1966).

La temperatura puede afectar el mecanismo hormonal de la floración por diversos medios. La temperatura puede influir en el ritmo de síntesis o de destrucción de los componentes que intervienen en la formación de hormonas, en el ritmo de su traslado de las hojas a los meristemos, y en la efectividad de la hormona u hormonas en la producción de cambios morfogénicos en los meristemos (Mayer *et al.*, 1966).

La temperatura del período de oscuridad tiene importante influencia sobre las reacciones fotoperiódicas de las plantas y sobre su crecimiento reproductivo. Existen algunas plantas que requieren temperaturas relativamente bajas, algunas relativamente altas y otras florecen en una amplia gama de temperaturas. La floración de las plantas de la primera categoría es afectada desfavorablemente en climas cálidos; las de la segunda categoría, en los climas fríos (Mayer *et al.*, 1966).

La influencia de la temperatura sobre las reacciones fotoperiódicas, afecta la aparición de primordios florales, lo cual está más relacionado, para algunas especies, con la temperatura del período de oscuridad que con la temperatura del fotoperíodo (Salisbury y Ross, 1994). La acción de bajas temperaturas retarda la iniciación floral, dado que con el descenso de las temperaturas se reprime el traslado de sustancias inductoras de la floración o de la diferenciación de las partes florales (Salisbury y Ross, 1994).

La temperatura controla no sólo la tasa de crecimiento y el desarrollo, como podría esperarse sino que también modifica la longitud crítica del día para la iniciación floral y posiblemente el desarrollo. Dentro de rangos específicos de longitud del día y temperatura, las temperaturas elevadas (28-32 °C) resultan en una mayor longitud crítica del día. Además el promedio de temperatura del día y la noche no es tan importante como las temperaturas máximas y mínimas del día o de la noche (Grueber, 1985).

La longitud crítica del día para la iniciación floral decrece conforme la temperatura se incrementa, y se incrementa conforme la temperatura nocturna se incrementa. Se sabe que altas temperaturas (21° C, 18° C para algunos cultivares) causan un cese en la iniciación y/o el desarrollo (Larson *et al.*, 1978).

Las temperaturas que son detectadas por los tallos son más importantes en el proceso de iniciación floral que aquellas detectadas en la raíz. Los experimentos de Hackett y Kofranek (1971, en Grueber 1985) muestran que aún bajo condiciones de días largos, favorables para el crecimiento vegetativo, breves exposiciones de los tallos a las bajas temperaturas (16°C) pueden estimular la iniciación.

La interacción de la temperatura y el fotoperíodo es todavía mas manifiesta durante el estado de desarrollo después de la inducción floral. Mientras que muchas investigaciones no indican las fechas reales de iniciación floral o la tasa de desarrollo, pueden hacerse inferencias acerca de los efectos de la temperatura sobre el desarrollo. Por ejemplo, temperaturas nocturnas de 10° C ó 27 ° C resultan en el cese de la antesis cuando se comparan con 10° C ó 21° C, pero el decremento en la longitud del día supera este cese a 27° C.

La temperatura nocturna es más importante en la percepción del fotoperíodo y la iniciación floral. La temperatura del día es más importante en las tasas de crecimiento y desarrollo (Grueber, 1985).

La nochebuena es en general una planta de temperatura media (entre 22 y 24° C) y cuando se le proporciona la luz del sol adecuada, crece vigorosamente en el rango de 20°- 30° C, con el límite más bajo para el crecimiento cerca de 12° C. La temperatura del invernadero puede aumentar considerablemente a los 30° C durante el verano a menos que exista un sistema de ventilación eficiente enfriamiento por evaporación o alguna reducción de la luz.

Las temperaturas de más de 35° C pueden dar como resultado un crecimiento reducido, tallos delgados, hojas pequeñas, enraizamiento más lento de los esquejes y crecimiento deforme. Las plantas madre de nochebuena se pueden sacar al aire libre en verano para que se recuperen más rápidamente en lugar de esperar las temperaturas nocturnas más frescas de finales del verano (Larson, 1988).

La temperatura óptima de crecimiento disminuye con la reducción de la luz disponible a mediados del verano y durante la temporada cálida el mejor crecimiento de la planta es entre 14° y 18° C. La temperatura óptima de cultivo en invernadero para la producción de nochebuena se ha considerado cerca de los 17° C con temperaturas diurnas de hasta 22° y 25° C. Los costos actuales de energía dictan que éstos se reduzcan hasta donde sea posible para terminar con una cosecha de buena calidad a tiempo para las ventas de Navidad (Martínez, 1995).

Es conveniente reducir la temperatura nocturna, para muchos cultivares de brácteas rojas, conforme se aproximan a la madurez, para estimular el color de las brácteas. Las plantas de floración temprana pueden mantenerse en el invernadero a una temperatura nocturna mínima de unos 10° C hasta que sean vendidas, sin reducción en la calidad asumiendo que se pueda mantener una humedad relativamente baja (Martínez, 1995).

Cuando las temperaturas son más bajas que las óptimas en el proceso de floración, existe un desarrollo lento y un retraso en la fecha de floración, por lo que la producción saldría para la tercer semana del mes de diciembre afectando así los precios de venta de dicha planta (Harrison, 1967). Temperaturas demasiado altas por la noche durante el periodo de floración, hacen necesario un mayor período de oscuridad durante la noche (14 horas) (Martínez, 1995).

Temperaturas inferiores a los 16 °C durante el proceso de floración afectarán este proceso notablemente. La floración se atrasa mucho y las flores serán muy chicas. Además, las temperaturas bajas promueven el desarrollo de algunas enfermedades en el follaje y en las brácteas (Martínez, 1995). Temperaturas de 12 °C de 6:00 a 8:00 de la

mañana muestran un mayor incremento en crecimiento (Sausser y Heintze, 1997). Temperaturas de 21 y 24° C en el día ayudan al mejor desarrollo de brotes axilares y hojas en Eckespoint (Faust y Heins, 1996). Temperaturas más altas durante el día que por la noche, aunado a un riego ayuda a tener un adelanto en la inducción a floración para el caso de los cultivares Supjibi, Libertad, y Angelika (Holcomb *et al.*, 1996).

3.3.3.2 Diferencial de Temperaturas

Actualmente los productores cuentan ya con una nueva tecnología para el control de altura de diversos cultivos mediante el Diferencial de Temperatura (DIF), el cual ha determinado que existe una relación directa entre la altura de las plantas y el diferencial entre temperatura del día (diurna) y la temperatura nocturna (Holcomb *et al.*, 1996). Este diferencial se define como:

$$\text{DIF} = \text{Temperatura diurna} - \text{temperatura nocturna.}$$

La altura de las plantas de nochebuena se puede controlar con la manipulación del DIF, ya que en este cultivo, la altura de planta es una de las características que mejor responde al manejo de temperaturas. El cambio de un DIF positivo hacia un DIF cero produce una enorme reducción en la altura de las plantas. Aunque la altura sigue disminuyendo con el cambio de un DIF cero hacia un DIF negativo, el efecto es de menor magnitud (Holcomb, *et al.*, 1996).

La temperatura promedio durante el día es la que determina el desarrollo de un cultivo. En el caso particular de la nochebuena, también regula la floración, la cual tiene una temperatura promedio óptima de 21° C. Así, un cultivo que ha estado sometido a una temperatura máxima de 28° C y mínima de 14° C (promedio = 21° C, DIF = 14) tendrá el mismo desarrollo y tiempo de floración que un cultivo sometido a una temperatura máxima de 23° C y mínima de 19° C (promedio = 21° C, DIF = 4), pero la altura será menor (Martínez, 1995).

La máxima elongación de los entrenudos se presenta durante la noche, con un pico hacia el amanecer. Basándose en lo anterior, se puede lograr un buen control en la altura de las plantas de nochebuena mediante la reducción de la temperatura únicamente durante las dos horas siguientes al amanecer (Martínez, 1995).

Aunque los cultivares tengan una tendencia similar en la iniciación, pueden mostrar diferencias en el tiempo al inicio de la pigmentación.

Con relación al crecimiento, en una planta de nochebuena es importante considerar los siguientes aspectos:

- **Espaciamiento de las plantas.** Cuando las plantas se colocan demasiado juntas se sombrean entre sí, provocando el alargamiento (Martínez, 1995).
- **Temperatura.** Dentro de cierto límite las temperaturas promueven la actividad metabólica de las plantas, la cual a su vez tiene como consecuencia un crecimiento mayor. Con temperaturas demasiado elevadas o demasiado bajas el crecimiento se reduce y hasta llega a detenerse (Martínez, 1995).
- **Manejo de la luz.** Cualquier foco o lámpara cercana al invernadero o en los alrededores durante la noche puede retrasar la floración. Una baja radiación solar en el día puede también retrasar la floración y disminuir la velocidad de desarrollo de las flores y brácteas (Martínez, 1995).

3.4 Fitocromo

3.4.1 Acción Fundamental

La planta necesita moléculas fotorreceptoras especiales para poder reaccionar a la luz; la clorofila está relacionada con la síntesis de carbohidratos a partir de la energía lumínica, pero las plantas también reaccionan a la luz con respecto a su desarrollo, y estas reacciones están reguladas por el fitocromo cuyas moléculas están embebidas a las membranas del retículo endoplásmico (Rojas y Ramírez, 1991).

El fitocromo es una cromoproteína cuyo grupo cromóforo es de estructura tetrapirrólica abierta como en las ficobilinas. El fitocromo controla una gran cantidad de procesos fisiológicos regulados por luz, de los cuales tenemos (Galston y Davies, 1970):

- Germinación de las semillas.
- Alargamiento de pecíolos y entrenudos.
- Crecimiento de hojas.
- Formación de primordios foliares.
- Síntesis de clorofila.
- Floración.
- Distribución de fotoasimilados.
- Formación de tubérculos
- Diferenciación de estomas.

3.4.2 Localización del fitocromo

Los estudios sobre localización del fitocromo son todavía muy incompletos. Rojas y Ramírez (1991) mencionan que las moléculas de fitocromo están embebidas a las membranas del retículo endoplásmico. Sin embargo, esta cromoproteína ha sido detectada en la cercanía de la membrana nuclear de las células de coléoptilo de avena y tallos de chícharo, aunque en otros lugares el fitocromo puede estar presente en cantidades tan pequeñas que no pueden ser medidas (Saldaña, 1992).

En otras pruebas se dedujo que el receptor del estímulo luminoso es la membrana celular y se ha demostrado que el fitocromo tiene una orientación fija dentro de la membrana celular y que su orientación puede cambiar de acuerdo a la longitud de onda y a la luz aplicada (Galston y Davies, 1970).

3.4.3 Formas del fitocromo en la planta

Pérez y Martínez (1994) mencionan que en las plantas el fitocromo se presenta bajo 2 formas interconvertibles (Pr y Pfr) por luz de diferentes longitud de onda o por la oscuridad.

La forma inactiva del fitocromo (Pr) tiene un máximo de absorción en la luz roja y al absorber luz roja (longitud de onda de 660 nm) se convierte en la forma activa del fitocromo (Pfr). A su vez la forma Pfr presenta una absorción máxima en el rojo lejano (longitud de onda de 730 nm) y al absorber luz rojo lejano se convierte en la forma Pr. También se sabe que en la oscuridad la forma Pr se transforma muy lentamente en Pfr (Bidwell, 1990).

La falta de Pfr determina floración en plantas de día corto y ausencia de floración en plantas de día largo. Es decir el Pfr actuaría inhibiendo la floración en Plantas de Día Corto y estimulando la floración en Plantas de Día Largo (Pérez y Martínez, 1994).

La forma Pr es la más estable pero inactiva, mientras que el Pfr es más inestable pero es la forma activa a partir de la cual se inician las reacciones bioquímicas que determinarán las respuestas fisiológicas en las plantas (Bidwell, 1990).

Se cree que el Pfr reacciona con algún compuesto ó compuestos aún desconocidos (X) para desencadenar dichas respuestas fisiológicas, o que se autodestruye por ser tan inestable (Bidwell, 1990).

3.4.4 Mecanismos de acción del fitocromo.

Aún no se conocen de manera exacta el o los mecanismos por los cuales el fitocromo actúa.

Algunas hipótesis sostienen que interviene al nivel de represión o desrepresión de genes que controlan la síntesis de ciertas enzimas. Otra hipótesis afirma que actúa modificando la permeabilidad de las membranas intracelulares, permitiendo que interaccionen

sustancias ya presentes en las células pero almacenadas en comportamientos separados. (Pérez y Martínez, 1994).

3.5 Variedades de nochebuena cultivados en México.

En general existen dos tipos, que son las silvestres (para jardines), y las híbridas para macetas e interiores. La variedad ideal para interiores debe tener características como: forma compacta con muchos brotes laterales, flor grande de color brillante con centro cerrado, follaje oscuro que no se caiga, resistentes a enfermedades e insectos, floración temprana y tolerancia al calor y al frío. En la actualidad no hay variedades que reúnan todas estas características (Villegas, 1990).

Debido al esfuerzo de muchos productores especializados en el mundo para mejorar las variedades híbridas, se han logrado obtener muchas de ellas las cuales continuamente están reemplazando a variedades anteriores. Dentro de las variedades que han tenido gran aceptación y que han acaparado el mercado nacional son: Las series Gross (Supjibi), Gutbier (V-17) , Eckespoint (Silver Star) y otros.

3.5.1 Características de las variedades.

SERIE: Gross.

Es una serie de crecimiento corto, floración temprana y de brácteas grandes, el centro de las brácteas es muy cerrado y tiene ciatios grandes. Las hojas y las brácteas son gruesas por lo que se requiere un cuidado especial durante el transporte y empaque para evitar que se quiebren. Los brotes son gruesos y fuertes, difíciles de romper en el transporte. Tiene buena ramificación y prefiere los climas cálidos. Su grupo de respuesta es de 8 1/2 semanas. Las variedades en este grupo son:

- i. **Supjibi roja** : Brácteas rojo brillante.
- ii. **Supjibi rosa**: Brácteas rosa brillante.
- iii. **Supjibi blanca**: Brácteas blancas brillante.

Para un mejor desarrollo de sus brotes (esquejes) deben mantenerse condiciones de temperaturas de 16 – 18 °C por las noches y de 24 - 26 °C durante el día, sin excederse de 32 °C, una intensidad lumínica de 4,500 a 6,500 pie candela (48,400 a 6,991 lux), a lo largo del día.

Variedad Supjibi Roja.



Esta planta se recomienda para macetas de 6 a 11 pulgadas, es una planta muy vigorosa de crecimiento rápido, brotan todas sus yemas, sus brácteas son de color rojo intenso y sus hojas de un verde fuerte, las flores llegan a medir hasta 50 cm (brácteas). No necesita reguladores de crecimiento. Dentro de sus desventajas la principal es que se maltrata fácilmente con el transporte y es más tardado para enraizar. Cultivar que crece muy bien si en su sustrato mantiene un pH de 5.8 a 6.2 y una conductividad eléctrica (C.E.) de 1.2 a 2.0 mmhos/cm.

SERIE: Gutbier

Esta serie comprende cultivares de excelente ramificación, hojas grandes y con un verde más claro que Supjibi, floración temprana y de brácteas medianas, el centro de las

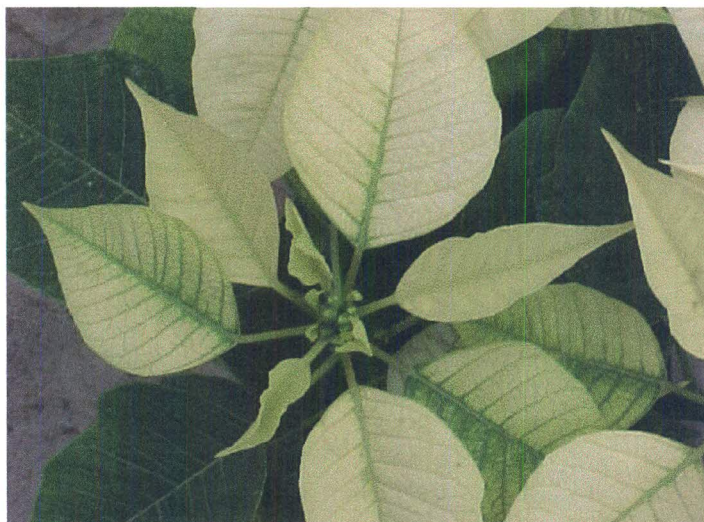
brácteas es muy cerrado y tiene ciatios pequeños. Las hojas y las brácteas son gruesas por lo que se requiere un cuidado especial durante el transporte y empaque para evitar que se quiebren. Tiene buena ramificación y prefiere los climas cálidos. Grupo de respuesta de 9 semanas.

Cuatro cultivares comprende este grupo:

- i. **Gutbier V-17 Angelika:** Brácteas de color rojo brillante.
- ii. **Gutbier V-17 Rosa:** Brácteas de color rosa oscuro.
- iii. **Gutbier V-17 Blanca:** Brácteas blancas.
- iv. **Gutbier V-17 Marble:** Es la variedad de mayor contraste entre sus colores, que todas las variedades mármol, pues tienen un color rosa más fuerte.

Para un mejor desarrollo de sus brotes (esquejes) debe mantenerse condiciones de temperaturas de 14 – 16 °C por las noches y de 24 - 28 °C durante el día, sin excederse de 32 °C, una intensidad lumínica de 4,500 a 6,500 pie candela (48,400 a 6,991 lux), a lo largo del día.

Variedad V-17 Angelika.

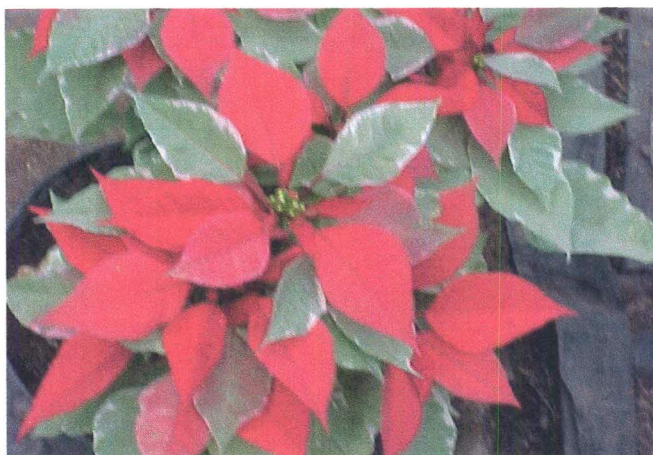


Esta variedad se recomienda para macetas de 7 a 11 pulgadas, es un poco menos vigorosa que la Supjibi, las brácteas son de un blanco medio y el follaje es de un verde medio, retiene muy bien el follaje y resiste mejor el transporte, su flor es semejante en tamaño que la Silver Star. Este cultivar crece muy bien si se mantiene en su sustrato un pH de 5.5 a 6.5 y una conductividad eléctrica (C.E.) de 1.5 a 2.0 mmhos/cm.

SERIE: Eckespoint

Esta serie se distingue por sus brácteas en forma de hojas del roble, esta planta es compacta, brotan todas sus yemas, no requiere del uso de reguladores de crecimiento, es de floración temprana y es una de las más apropiadas para México, es resistente al transporte. Su grupo de respuesta es de 8 semanas. Para un mejor desarrollo de sus brotes (esquejes) debe mantenerse condiciones de temperaturas de 14 – 16 °C por las noches y de 24 - 28 °C durante el día, sin excederse de 32 °C, una intensidad lumínica de 4,500 a 6,500 pie candela (48,400 a 6,991 lux), a lo largo del día.

Variedad Silver Star



De esta variedad existen dos colores: rojo y rosa, estas nochebuenas se comportan mejor si se les cultiva para tallos simples. Es la mejor variedad para cultivarse en maceta de 6 pulgadas, su flor es mediana en zonas templadas, pero en climas más cálidos es grande. Su tonalidad de rojo es medio y su follaje es de un verde suave. Las brácteas son de larga duración, las hojas con bordes blanco nieve. La producción de esquejes es limitada pero las raíces se forman rápidamente. Se cultiva mejor como planta estándar pero tendrá como promedio 5 ramas de floración cuando se despunta. Cultivar que crece muy bien si se mantiene en su sustrato un pH de 5.8 a 6.2 y una conductividad eléctrica (C.E) de 1.2 a 2.0 mmhos/cm.

Variedad Marble Star.



Esta variedad es la alternativa más moderna a los tradicionales colores de la nochebuena, ya que sus brácteas son de color rosa jaspeadas con bordes de color blanco crema. Es una variedad de crecimiento lento y corto, por lo que no requiere de reguladores del crecimiento; debido a ello, puede cultivarse a una mayor densidad de macetas por metro cuadrado, se emplea para tallos simples o pinzados. Grupo de respuesta de 8 semanas.

Cultivar que crece muy bien si se mantiene en su sustrato un pH de 5.8 a 6.2 y una conductividad eléctrica (C.E) de 1.2 a 2.0 mmhos/cm.

3.6 Proceso de pigmentación en flores.

Los pigmentos que actúan como fotorreceptores del estímulo luminoso, con relación a la acción foto reguladora del crecimiento y desarrollo de las plantas son los carotenoides, el fitocromo y la flavina en la banda azul, para longitudes de onda superiores a 500 nm; el responsable es el fitocromo (Alpi y Togonif, 1987). Otros pigmentos fotorreceptores son las clorofilas y antocianinas.

3.6.1 Clorofilas y carotenoides

Durante la maduración de las flores uno de los síntomas más obvios son los cambios de color debidos a la transición de cloroplastos ricos en clorofila, a cromoplastos ricos en pigmentos carotenoides y a la destrucción de la clorofila. Los carotenoides, localizados en plastidios, cloroplastos y cromoplastos en flores, proporcionan los colores amarillos, naranja y rojo.

3.6.2 Constituyentes del color

3.6.2.1 Flavonoides

Los flavonoides comprenden un grupo diverso de compuestos que llevan a cabo una amplia gama de funciones. A este grupo pertenece la mayor parte de los pigmentos que confieren colores que van desde el rojo al violeta. Los flavonoides son metabolitos secundarios que se acumulan en la vacuola de las plantas vasculares, estos compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes, quelatantes metálicos y como son aromáticos pueden proteger a la planta de la radiación ultravioleta (Asen, 1979).

Las antocianinas contenidas en las vacuolas son un tipo de flavonoides muy importante, al que se debe el color de las flores y los frutos. Las pelargonidinas, cianidinas y delphinidinas son consideradas como las principales antocianinas responsables del color en las flores. La proporción entre los diversos compuestos de antocianinas puede variar

el color final. Las antocianinas proporcionan colores rojos, azules y púrpuras principalmente a las hojas, tallos, raíces y flores.

Algunos otros flavonoides como las flavonas y flavonoles, chalconas además de auronas y carotenoides influyen como copigmentos en la definición del color. Intervienen también otros factores como iones metálicos y el pH de la vacuola (Buchanan et al., 2005).

Rouhani y Khosh-Khui (1977) encontraron actividad fotosintética en hojas pigmentadas de rojo-púrpura de 14 cultivares de *Coleus*. Saunders y McClure (1972) encontraron la presencia de flavonoides glucósidos en los cloroplastos.

3.6.2.2 Síntesis bioquímica de los flavonoides

El esqueleto básico de carbono de la molécula flavonoide está formado a partir de la condensación de tres unidades de acetato y una unidad de ácido hidroxicinámico que dan como producto la chalcona, intermediario central en la biosíntesis de flavonoides. Las chalconas son modificadas para formar las flavonas, las cuales dan lugar a la formación de tres clases de flavonoides: flavones, flavonoles y antocianinas. Los flavones y flavonoles pueden afectar indirectamente la pigmentación; sin embargo, las antocianinas contribuyen directamente al color de la flor (Jordan, 1993).

El primer flavonoide es producido por la chalcona sintetasa a través de la condensación del 4-coumaroyl CoA con tres moléculas de malonyl CoA para formar una chalcona. Posteriormente, la chalcona isomerasa cataliza un anillo estereo-específico para convertir la chalcona a flavonona. La hidroxilación enzimática de las flavononas da lugar a la formación de dihidroflavonoles los cuales sirven como precursores directos para la síntesis de antocianinas (Jordan, 1993).

Se necesitan varios pasos enzimáticos para convertir los dihidroflavonoles a antocianinas y que estos productos puedan ser transportados a través de la membrana vacuolar, dado que los dihidroflavonoles son citosólicos mientras que las antocianinas se encuentran exclusivamente en la vacuola (Jordan, 1993).

3.6.2.3 Síntesis de antocianinas

La estructura química de las antocianinas es una molécula de benzopirano unida a un anillo fenílico: la forma normal en que se encuentra en las plantas es como B-glucósido. Siendo los azúcares más comunes la B-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa y la xilosa. El color de las antocianinas depende de su estructura química, el pH del medio que le rodea y de su interacción con iones.

El primer paso hacia la síntesis de antocianinas a partir del dihidroflavonol es una reducción en la posición 4 del anillo del carbono para dar leucoantocianidina, la enzima responsable en el proceso es la dihidroflavonol 4 – reductasa (Jordan, 1993).

Las leucoantocianidinas son convertidas a antocianinas coloreadas. Entre las enzimas que participan se pueden incluir una hidroxilasa y una hidratasa. La adición de un residuo de glucosa a la posición 3 del anillo de carbono de la antocianina por la UDPG: flavonoide 3-O glucosiltransferasa, estabiliza las agliconas y pone en marcha la molécula coloreada para ser transportada a través de la membrana de la vacuola (Jordan, 1993).

Los glucósidos de 3-antocianidín pueden ser modificados para dar lugar a más compuestos altamente glicosilados, aislados y metilados; estas reacciones se llevan a cabo en una secuencia ordenada (Jordan, 1993).

Las antocianinas son sintetizadas a partir de la estructura de pelargonina a partir de la cual se deriva la pelargonidina (figura 1).

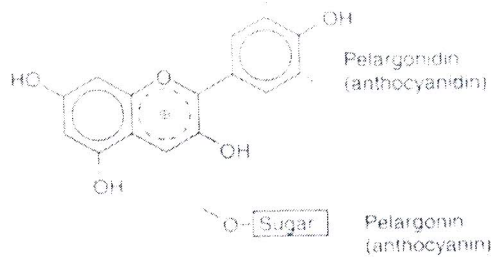


Figura 1. Estructura molecular de la pelargonina y pelargonidina

Por sucesivos procesos de metilación a partir de la pelargonidina se suceden diversas sustituciones en las posiciones 3' y 5' del anillo de fenilo, dando lugar a más pigmentos como se muestra en el cuadro 2 y figura 2.

Cuadro 2. Principales antocianidinas y sus sustituyentes en la molécula de pelargonidina.

Antocianidina	Sustituyente	Color
Pelargonidina	---	Naranja-rojo
Cianidina	3'-OH	Rojo
Peonidina	3'-OCH ₃	Rosa
Delfinidina	3'-OH, 5'-OH	Azul-púrpura
Petunidina	3'-OCH ₃ , 5'-OH	Púrpura
Malvidina	3'-OCH ₃ , 5'-OCH	Rojizo-púrpura

Fuente: Heldt (1997)

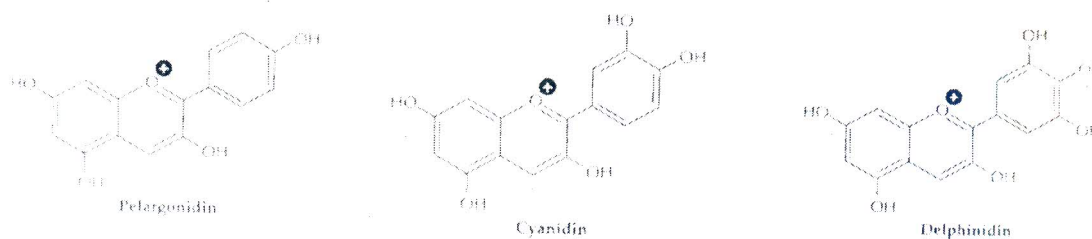


Figura 2. Estructura molecular de las tres principales antocianinas en flores (Buchanan, *et al.*, 2005)

La luz en la biosíntesis de antocianinas

El papel de la luz en la regulación de biosíntesis de antocianinas está muy documentado. Datos experimentales sobre el papel de la luz en la pigmentación floral son sin embargo muy limitados debido a las dificultades de crecimiento de las flores en completa oscuridad. El análisis de la acción de la luz sobre la biosíntesis de antocianinas depende de observaciones hechas sobre otros tejidos (semillas, hipocótilo). (Jordan, 1993).

Se han identificado tres tipos de fotorrespuestas que están implicadas en la biosíntesis de antocianinas en diferentes especies y tejidos: una respuesta del fitocromo, una respuesta a la luz azul y una respuesta a los rayos ultravioleta B. Estos sistemas son altamente sensibles para la pigmentación, aunque puede haber también una alta respuesta por inducción de la luz. A partir de la luz blanca es como se produce mayor cantidad de antocianinas (Jordan, 1993). Tanto los flavonoles como las antocianinas (componentes de la pigmentación de nochebuena) tienen una absorción apreciable en la región ultravioleta (200 – 300 nm) (Semeniuk y Stewart, 1979).

Kannangara y Hansson (1998) mostraron que la inducción floral, que da lugar a la acumulación de antocianinas, también resulta en la detención de la formación de clorofila en las hojas de la inflorescencia y las brácteas de *E. pulcherrima*. Los autores detectaron que los niveles de todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de clorofila decayeron durante la acumulación de antocianina. Para Kannangara y Hansson (1998) es evidente que las plantas de *E. pulcherrima* requieren unas cuatro semanas de exposición a los días cortos para la inducción de la inflorescencia roja.

3.7 Antecedentes sobre pigmentación en *E. pulcherrima*.

Stewart *et al.*, (1980), mencionan que las diversas tonalidades en nochebuena se deben a que son quimeras de tipo periclinal. En los diversos estudios de nochebuena se han encontrado cinco diferentes antocianinas y 10 pigmentos de flavonol que son importantes para su color.

Las primeras investigaciones que se realizaron sobre pigmentación de nochebuena se remontan hacia 1939 cuando Lawrence *et al.*, identifican a la cianidina como la principal responsable del color rojo en nochebuena (Lawrence *et al.*, 1941). Hacia la década de los 50's y 60's, los estudios de Asen (1958), Harbone (1958), Marousky (1968), Geissman y Jurd (1955) determinaron la absorción máxima para la pelargonidina (antocianinas menores) y la cianidina (antocianinas mayores). Los resultados de estos autores muestran valores de absorbancia muy similares entre sí. Asen (1958) también determinó la absorbancia máxima para algunos azúcares presentes en las brácteas de nochebuena asociadas con las antocianinas, las cuales tienen influencia en la variación del color.

Banerji y Sharman (1979) estudiaron la composición de pigmentos en *E. pulcherrima* en tres tipos de follaje: totalmente verde, hojas rojo-verdosas y brácteas rojas. Las brácteas rojas contenían la cantidad máxima de antocianidina, en las hojas rojoverdosas se encontró una cantidad menor mientras que en las hojas verdes no pudo detectarse la presencia de antocianidinas. Según estos autores el contenido de cloroplastos en hojas con antocianidina (brácteas rojas), es intrínsecamente más activo (en un 60%) que en las hojas verdes y hay hasta un 7 % más de actividad que aquellos de las hojas rojoverdosas. Estos autores encontraron una proporción de 0.5 de clorofila b con respecto a la a en el follaje verde y verde rojizo y cerca de 0.3 en las brácteas.

En las brácteas rojas y hojas rojoverdosas Banerji y Sharman (1979), detectaron dos tipos de antocianidinas: la cianidina y la pelargonidina en razón aproximada de 2:1. Es notoria la asociación entre un mayor contenido de antocianidina con una mayor actividad clímax en las hojas. Estos resultados indican que las brácteas rojoverdosas, aunque completamente pigmentadas como los pétalos, son capaces de fotosintetizar y llenar al menos en parte, sus requerimientos nutricionales.

Asen (1979), identificó las siguientes antocianinas en nochebuena por el método de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): cianidin-3-galactosida, la 3-glucosida, 3- rutinosida de cianidina y pelargonidina. Los flavonoles presentes fueron: 3-

rhamnosilgalactosida, 3-rhamnosilglucosidas, 3-galactosidas, 3-glucosidas, 3-rhamnosidas de quercetina y kaempferol (Asen, 1979).

Mitchell *et al.*, (1998) estudiaron la química de pigmentos y el color en flores de *Pelargonium* (malbón). Las especies estudiadas con flores color crema (amarillo pálido), carecen de niveles medibles de carotenoides pero contienen altos niveles de flavonol glucósidos: (7-0-glucósidos, como la quercetin 7-0-glucósido) y 3-0mono y di-glucósidos. Otras cuatro especies mostraron un balance contrario de pigmentos, esto es, la carencia de flavonoides pero la presencia de carotenoides. Los autores concluyen que la coloración en estas flores color crema resultan de la presencia de flavonoles en el grupo formador y de carotenoides en el último. Se encontraron también antocianinas. Estas causan el contorno negro-rojizo evidente en la mayoría de las flores de *Pelargonium* (Mitchell *et al.*, 1998).

Los colores en sombras de rosa, naranja, salmón, rojo y púrpura en *Pelargonium*, parecen derivar enteramente de las antocianinas constituyentes con niveles significativos de carotenoides. Sin embargo, debido a la manifestación de color de las antocianinas se modifica por factores como el pH, copigmentación, concentración y acilación (Mitchell *et al.*, 1998).

Los niveles de pH determinados en el pétalo por maceración se confinaron a un rango ajustado entre 3.0 y 3.9. Los niveles más altos se encontraron únicamente en los pétalos rojo/púrpura, normalmente la porción más externa de los pétalos muestra un pH más alto que la porción interna. En general parece ser que el pH del pétalo tiene un efecto pequeño sobre el color.

Las antocianinas van acompañadas de flavonol glucósidos en todos los pétalos de *Pelargonium*. Los flavonoles encontrados en el rango de las flores estudiadas fueron todos glucósidos de kampferol, quercetina y miricetina e incluyen a los 3-ramnosidas, 3-glucósidos y 3-rutinosidas como mayores componentes, pero con distribución variable. Los niveles totales de glucósidos flavonoides están generalmente excedidos

por los de las antocianinas. En pétalos con diferenciación de color, el nivel relativo de flavonoles es más alto en la parte interna del pétalo más intensamente coloreada, que en la parte más externa. Una consecuencia de esto puede ser un incremento en la intensidad del color a través de la copigmentación entre los flavonoles y las antocianinas (Mitchell *et al.*, 1998).

Estos mismos autores encontraron que la coloración rosa resulta de los niveles relativamente bajos de las antocianinas en la presencia de niveles altos de flavonoles los cuales pueden requerirse para estabilizar las antocianinas y prevenir la pérdida de color a través de la hidratación. En los pétalos con mayores niveles de antocianinas tiende a ocurrir la estabilización a través de la propia asociación. Los rosas fuertes resultan de la predominancia de los glucósidos de peonidina. La tinción púrpura claro en una variedad puede deberse al reemplazo de cerca de la mitad de peonidina con malvidina. En este caso, los niveles totales de antocianinas (muy bajos) en contraste con el fondo blanco el pétalo resultó en un color pálido, el cual puede estabilizarse por los niveles relativamente altos de flavonoles.

En los cultivares rojos analizados por Mitchell *et al.* (1998), es muy similar la composición de pigmentos y de flavonoles. La pelargonidina predominante es acompañada por la peonidina en todos los cultivares y el flavonol más abundante es el kampferol. En términos de color no es evidente algún efecto de copigmentación. Los niveles de antocianinas significativamente más altos, y en particular la pelargonidina, distingue esas flores de las flores rosas y en consecuencia pueden considerarse como responsables de la coloración roja.

Las brácteas de los cultivares blancos, carecen de antocianinas, pero tienen más flavonoles que los cultivares rojos. Las hojas de la mayor parte de los cultivares de nochebuena producen sólo pequeñas cantidades de antocianina en la epidermis del pecíolo (Semeniuk y Stewart, 1979).

Stewart y Arisumi (1966), mostraron que las partes rosas de nochebuena eran quimeras periclinales con epidermis incolora. Concluyeron que el color rosa es debido a la dilución causada por espacios de aire en el mesófilo esponjoso del pigmento rojo que se encuentra principalmente en la capa epidérmica compacta de los cultivares rojos padres. Estos autores encontraron que los componentes mayores en las antocianinas fueron la cianidin-3-glucosida (crisantemina) y cianidin-3-ramnoglucosida (antirina). Las antocianinas menores fueron la pelargonidina-3-glucosida (calistefina) y la pelargonidin-3-ramnoglucosida.

Los extractos de las brácteas rosas se compararon con diluciones conocidas de brácteas rojas y mostraron de 4 a 5 veces menos antocianinas que las brácteas rojas. Comparaciones visuales mostraron que dentro de cada planta, los dos compuestos de cianidina se produjeron en iguales cantidades (Stewart y Arisumi, 1966). Las proporciones de antocianinas encontradas en partes rosas y en sus progenitoras rojas no difieren entre sí. Mientras que la producción de antocianinas fue diferente cuando genéticamente las células rojas fueron confinadas al tejido interno que cuando estaban en la epidermis, la síntesis de flavonoles no se vio afectada por la posición en las brácteas.

Stewart *et al.*, (1980), hicieron un análisis completo del sistema de pigmentos en tres familias de porte de nochebuenas. En las tres familias la proporción de cianidin-3-glucósidos a pelargonidin-3-glucósidos se incrementó conforme las antocianinas totales decrecieron. La proporción de cianidin-3-galactosida permaneció esencialmente constante, mientras que las rutinosidas decrecieron y las glucosidas se incrementaron. En las tres familias el contenido de flavonoles se incrementó mientras el contenido de antocianinas decreció. La supresión de la síntesis de antocianinas por mutación somática resultó en una síntesis mayor de flavonoles dentro del mismo soporte genético. Estos datos soportan la hipótesis de que la síntesis de antocianinas y flavonoles comparten un precursor que puede dar lugar de forma creciente a la síntesis de flavonoles cuando la síntesis de antocianinas es suprimida (Stewart *et al.*, 1980).

El contenido de antocianinas en células internas de las brácteas de quimeras rosas de poinsetias difiere de sus progenitoras rojas tanto en la cantidad como en la proporción de cinco diferentes antocianinas. Hay relativamente más cianidin-3-glucósidos que pelargonidin-3-glucósidos en las brácteas rosas, en comparación a las rojas. Las proporciones de glucósidos a rutinosidas fueron también mayores en las brácteas rosas. La proporción de cianidin-3-galactosida al contenido de antocianinas totales fue esencialmente constante en las brácteas rosas y en las rojas. Los portes rosas y blancos contienen más flavonoles que sus progenitores de brácteas rojas pero las proporciones son esencialmente las mismas, lo que sugiere una mayor estabilidad genética en el patrón de síntesis de flavonoles que en el de antocianinas (Stewart *et al.*, 1980).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Material vegetal

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron seis variedades de nochebuena: Supjibi roja, Supjibi rosa, V-17 Angelika, Silver Star, Freedom y Marble Star, con diferentes características en cuanto al color de las brácteas y hojas (ver 3.6.1 Características de las variedades).

4.2 Ubicación del experimento

El invernadero donde se realizó el experimento está ubicado en la comunidad de Xocotlán, Edo. de México, en el km dos de la carretera Texcoco – San Miguel Tlaixpan, el cual se encuentra entre los 19°31' de Latitud Norte y los 98°53' de Longitud Oeste. Se localiza en la provincia del Eje Neovolcanico, Subprovincia Lagos y Volcanes del Anahuac. El clima de esta región es un templado semiseco, con lluvias en verano y una temperatura media anual de 15.9 °C, que de acuerdo a García (1998) su nomenclatura es Cb (W1) (W) (i')g.

4.3 Manejo del cultivo

Para el cultivo y seguimiento de crecimiento se eligieron cuatro variedades: Supjibi roja, Marble Star, Silver Star y V-17 Angelika dado que de las otras no se tuvo material vegetal suficiente.

4.3.1 Preparación del sustrato y llenado de las macetas.

Se empleó como sustrato: 50 % de polvo de coco, 20% de arena de tezontle y 30 % de tierra de monte. El llenado de macetas se realizó a finales de julio, dando a cada maceta riegos pesados, con la finalidad de obtener el nivel real del sustrato y poder hacer una adecuada plantación.

4.3.2 La Plantación

Esta actividad se realizó el día 29 de julio, cuidando que el nivel del cepellón de la planta tuviera el mismo nivel del sustrato de la maceta, esto para evitar la muerte de las

plantas por ahogamiento si estas quedaran muy enterradas o por deshidratación si quedaran al descubierto.

4.3.3 Sobrenmacetado

Una vez terminada la plantación se puso bajo cada maceta, otra maceta invertida, para facilitar el drenaje del agua excedente y evitar el anclaje de raíces al suelo, así como el contagio de enfermedades.

4.3.4 Sombreo

Para evitar la aparición de quemaduras por acción del sol después del transplante, se colocó un sombrero con plástico blanco lechoso. Esto con la finalidad de proporcionar condiciones de luz difusa a la plantación y tener mayor eficiencia en el rendimiento de la planta (hasta un 20 % más) (Martínez, 1995).

4.3.5 Poda (Pinchado o despunte)

Esta práctica fue realizada en la misma fecha de plantación, la cual consistió en la eliminación del ápice. Esto para romper la dominancia apical de la planta y favorecer la brotación lateral (Barnes, *et al.*, 1996).

4.3.6 Fotoperíodo (Tratamiento de oscuridad)

El día cinco de septiembre se inició el tratamiento de noches largas, para lo cual se cubrieron las plantas con plástico negro desde las 18:00 h. a las 8:00 h. del día siguiente, durante 21 noches continuas.

4.3.7 Riegos

Los riegos al sustrato se daban de acuerdo a las necesidades de las plantas. En promedio se dieron riegos cada tres días. En el cuadro 1 se indica la calidad de agua requerida para el riego de nochebuena.

4.3.8 Control de plagas y enfermedades

Durante el ciclo de cultivo se hicieron aplicaciones de fungicidas e insecticidas con la finalidad de prevenir y controlar tanto plagas como enfermedades. Para enfermedades de la raíz como *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.*, *Phytium sp.*, *Phytophthora sp.*, se controlaron con productos como el Banrot, Alitte a dosis de 1 gl^{-1} de agua para ambos productos, aplicando al drench, dichas aplicaciones se realizaban cada 10 a 15 días. Además de preparación de caldo Bordelés, el cual se aplicó a intervalos de 10 días. Para el caso de enfermedades del follaje causadas por *Botrytis cinerea* y *Alternaria sp.*, se controlaron con Benlate y Bavistin a razón de 1 gl^{-1} de agua.

4.3.9 Espaciamientos y fertilización

Solamente se realizaron dos espaciamientos durante el periodo de cultivo, el cinco y 25 de octubre respectivamente. Su finalidad consistió básicamente en evitar entrecruzamiento de las hojas de las plantas y que los brotes crecieran normalmente en grosor, longitud y tuviesen un buen ángulo de inserción al no tener competencia entre ellos. La fertilización al sustrato (maceta) se realizó cada 8 días considerando un pH de 6.5 en la solución nutritiva con la siguiente fórmula (cuadro 3).

Cuadro 3. Fórmula empleada para la fertilización en maceta

Macroelementos	ppm	Microelementos	ppm
N	300	Cu	0.5-1
P	100	Zn	0.5-1
K	150	B	0.5-1
Ca	350	Mn	0.5-1
Mg	85	Mo	0.04

4.4 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue uno Completamente al Azar con 3 repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por dos macetas. Una vez realizado el análisis de varianza, se efectuó la comparación de medias de Tukey para las variables respuesta, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

4.5 Determinaciones de crecimiento vegetativo

Para estas determinaciones se consideraron tres brotes al azar, a todos los cuales se les dio seguimiento. Las mediciones se realizaron cada 10 días desde el 18 de agosto al 20 de noviembre de 2002. Las variables respuesta evaluadas fueron las siguientes:

4.5.1 Longitud de brotes

En tres brotes al azar se midió desde el punto de inserción de los brotes en el tallo principal hasta la parte terminal de dicho brote.

4.5.2 Diámetro basal de brotes

En tres brotes al azar se tomó esta medida con un vernier en la parte basal de cada brote.

4.5.3 Número de hojas por brotes

Se contabilizó el número de hojas en 3 brotes elegidos al azar.

4.6 Cuantificación de pigmentos

4.6.1 Contenido de clorofila

Para esta prueba se eligieron cinco variedades de nochebuena: Silver Star, Supjibi Rosa, Supjibi Roja, Marble Star y Blanca V-17. Para esta determinación se colectó la hoja anterior a la bráctea de transición de dos plantas con el mismo tratamiento (dos repeticiones).

Se determinó el contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) y clorofila total (Cltot) como sugiere la AOAC (1980) y con la técnica descrita por Withman *et al.* (1971), bajo el siguiente procedimiento: Se pesaron 100 mg de tejido fresco, se cortó en pedazos pequeños y se maceró el tejido en un mortero con 10 ml de acetona al 80 % v/v, se agitó de 5 a 10 minutos y se dejó reposar 3 minutos. Posteriormente se transfirió el líquido verde decantado a un embudo Buchner con un filtro Whatman N° 1 acoplado a un matraz Kitasato, mismo que se conectó a una bomba de vacío para obtener por succión el filtrado. Al residuo se le adicionaron 10 ml de acetona al 80 % v/v agitando por 5-10 minutos y se dejó reposar. Posteriormente se aforó a 10 ml con acetona para obtener el

volumen final y determinar la densidad óptica o absorbancia a 645 y 663 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D Milton Roy).

La cantidad de clorofila presente en el extracto (en miligramos de clorofila por gramos de tejido) se calculó de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{mg clorofila a/g de tejido} = [12.7(D663) - 2.69(D645)] \times V / (1000 \times W)$$

$$\text{mg clorofila b/g de tejido} = [22.9(D645) - 4.68(D663)] \times V / (1000 \times W)$$

$$\text{mg clorofila total/g de tejido} = [20.2(D645) + 8.02(D663)] \times V / (1000 \times W)$$

Donde:

W = peso de la muestra en gramos

V = Volumen final

4.6.2 Contenido de antocianinas totales

Esta evaluación estuvo sujeta a la disponibilidad de suficiente material vegetal, por lo que se eligieron las siguientes variedades: Supjibi Roja, Supjibi Rosa, Freedom, Silver Star y V-17 Angelika.

Para la extracción de los pigmentos de las brácteas se usaron 5 g de muestra de tejido vegetal de las brácteas pigmentadas, que se mezclaron con el disolvente (compuesto de metanol: ácido acético: agua, en proporciones 10:1:9 v/v/v respectivamente). Se realizaron tres extracciones sucesivas a temperatura ambiente con agitación, por 24 horas cada una. En la primera extracción se usaron 40 ml de disolvente, en tanto que en las dos posteriores se usaron 25 ml. Al término de cada extracción se decantó el extracto y se midió su volumen, se tomó una alícuota de 3 ml la cual se centrifugó a 14 000 rpm (20,000 rpg) por 15 min en una centrífuga Hermle Z 200M/H. Posteriormente se midió la absorbancia de los extractos de las muestras a 520 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Génesis 5. En todas las extracciones el pH se ajustó a 3 con HCl 1 N o NaOH 1N según se requería. Los datos del volumen del extracto decantado y el valor de

la absorbancia en cada una de las tres extracciones fueron considerados para realizar el cálculo de la antocianina total, como se especifica más adelante.

4.6.2.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Con el objeto de realizar un análisis cualitativo de antocianinas de las brácteas de nochebuena se empleó la técnica de HPLC en fase reversa, previo proceso de purificación de las muestras.

4.6.2.2 Purificación de las muestras para el análisis de antocianinas por HPLC

Se empleó una fracción de la primera extracción (ver 4.6.2) realizada bajo condiciones de refrigeración y empleando como disolvente TFA al 1 % en metanol. Se usaron 3 ml y la purificación incluyó dos etapas.

En la primera etapa se activó la amberlita con metanol durante 24 horas. En una segunda etapa se colocaron 30 ml de resina en una bureta y se le adicionó la muestra, se lavó dos veces con ácido acético al 5% en agua, después se adicionó ácido acético al 5 % en metanol y se dejó fluir lentamente para concentrar el pigmento y se colectó sólo el cuerpo del concentrado ya purificado. Se midió el volumen, se tomaron 200 µl, se concentraron con bomba de vacío, se agregaron 100 ml del disolvente B y se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se utilizó un equipo HP 1100, que consta de una bomba cuaternaria con desgasificador, un detector de UV- visible y un inyector manual. La columna analítica fue una Hypersil ODS (250x46 mm) con tamaño de partícula de 5 µm. Todos los disolventes usados en la identificación fueron grado HPLC, y antes de emplearse se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm de nylon blanco (millipore) (Fossen *et al.*, 2001).

Los disolventes que se usaron en la identificación fueron:

Disolvente A (Ácido fórmico : agua en relación 1:9 v/v).

Disolvente B (Ácido Fórmico : agua : metanol en relación 1:4:5 v/v/v).

La columna se mantuvo a 30 °C y la identificación se hizo a 525 nm. Se empleó un tiempo de corrida (stop time) de 21 minutos, la columna se lavó entre cada inyección (post time) durante 3 min. El volumen de muestra inyectado fue de 20 µl, se usó un sistema de gradientes según se describe en el cuadro 4.

Cuadro 4. Sistema de gradientes empleados en el análisis de antocianinas por HPLC.

Tiempo de retención (min)	Reactivos		Velocidad de Flujo (ml/min)
	A (%)	B (%)	
0.0	90.00	10.0	1.2
17.0	0.00	100.0	1.2
21.0	0.00	100.0	1.2
22.0	90.00	10.0	1.2

Empleando pelargonidina clorada se obtuvieron sus valores de absorbancia (Cuadro 5) y la curva tipo (estándar) (figura 3) con su correspondiente ecuación (Salinas, 2000; Rojas, 2003):

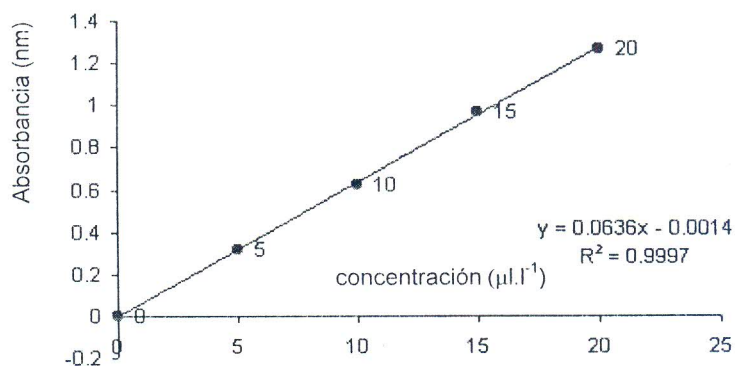


Figura 3. Curva estándar obtenida a partir de la pelargonidina clorada.

Cuadro 5. Absorbancia registrada por la Pelargonidina clorada para la construcción del estándar

UNIDADES (ml.l ⁻¹)	ABSORBANCIA
0	0
5	0.316
10	0.626
15	0.968
20	1.265

De esta ecuación se despejó la variable **X** cuyas unidades son $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de antocianinas, se obtuvo la siguiente ecuación en función de la variable **Y** cuyas unidades son de absorbancia en nm:

$$\mathbf{X = (y + 0.0014)/0.0636}$$

Sustituyendo en la ecuación la absorbancia obtenida de cada uno de los tres extractos, se calculó la variable **x** para cada uno de ellos. Este valor de **x** para cada extracto se multiplicó por el volumen respectivo para obtener la cantidad de antocianinas en microgramos. Se sumó la cantidad antocianinas de cada extracto en μg . La cantidad resultante se dividió entre 5 g de muestra (como se menciona en el párrafo anterior) obteniéndose la concentración total de antocianinas en $\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido fresco. Esta última unidad es equivalente a la expresión en mg/kg o sea ppm de antocianinas en tejido fresco. (Salinas, 2000; Rojas, 2003).

Posteriormente se determinó la materia seca en el tejido fresco de cada muestra obteniéndose los mg de antocianinas/ kg de tejido seco o bien expresándolas en % en base de humedad (como tejido fresco) o en base seca (como tejido seco) (Salinas, 2000; Rojas, 2003).

4.6.2.3 Extracción de antocianinas para HPLC

Se usaron 25 ml de ácido trifluoracético (TFA) al 1 % en metanol y la mezcla se mantuvo en refrigeración por 24 horas, se decantó el extracto y se midió el volumen.

Para calcular la cantidad de antocianinas individuales después de hacer la cromatografía de líquidos y verificar que los tiempos de retención de las antocianinas individuales no se interpretaran con un traslape de picos (tiempo de retención de 4 estándares diferentes entre sí; $P < 0.05$ Tukey) se usó el área debajo de la curva para cada antocianina en unidades de miliabsorbancia/segundo ($\text{mAU} \cdot \text{s}^{-1}$), que se transformó en porcentaje de área y se multiplicó por el valor de antocianinas totales mencionado anteriormente.

De esta forma se obtuvo la concentración de antocianinas individuales para cada variedad en mg/kg de tejido fresco, mg/kg de tejido seco y en % base humedad y en base seca.

4.6.2.4 Identificación de antocianinas.

La identificación de las antocianinas obtenidas se realizó por comparación con los estándares comerciales de malvidina, cianidina y pelargonidina 3-glucósido y un estándar natural obtenido de la cáscara de berenjena como fuente de delphinidina 3-glucósido.

En los cromatogramas obtenidos para cada variedad se calculó la proporción de cada antocianina con el 1 % del área de cada antocianina en dos repeticiones. La concentración de cada antocianina individual se obtuvo multiplicando el área de cada antocianina por la concentración total.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Variables de crecimiento

5.1.1 Longitud de brotes

Como se muestra en la figura 4, las variedades con mejor crecimiento en brotes fueron: V-17 y Supjibi con una longitud de brote promedio de 24.33 cm. Los brotes de esta variedad presentaron desde el primer muestreo, un mayor incremento en comparación con el variedad Marble Star, donde el promedio de crecimiento fue de 21.0 cm. En el anexo 1 se presentan los valores promedio de longitud de brotes por variedad en los diferentes muestreos.

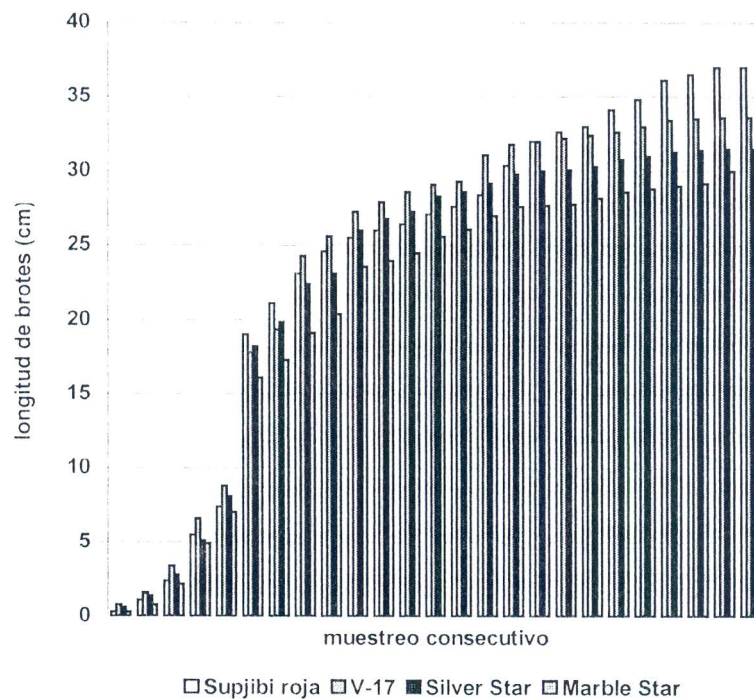


Figura 4. Longitud de brotes en cuatro variedades de nochebuena en Texcoco, México.

Se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) por variedad en la longitud de brote (Anexo 2). Se obtuvo un valor de $F = 0.0001 < \alpha = 0.05$, lo que indica que no todas las variedades evaluadas tienen la misma respuesta en crecimiento de brote en las mismas condiciones ambientales ni de manejo.

Las variedades Silver Star y Marble Star son de crecimiento compacto y las variedades Supjibi roja y V-17 son variedades de crecimiento medio en condiciones óptimas de temperatura (18 a 26 ° C). No obstante, en zonas de baja temperatura como lo es la región de Texcoco donde se tiene una temperatura media de 16° C de junio a diciembre, las cuatro variedades vieron disminuido su crecimiento, ya que responden mejor en climas más cálidos. En el caso particular de las variedades Supjibi roja y V-17 (Angelika) tienen genotipos de tallos fuertes y vigorosos que responden mejor a temperaturas bajas, por lo que no se vio tan afectado su crecimiento.

5.1.2 Diámetro basal de brotes

En el anexo 3 se presentan los valores promedio por muestreo para la variable diámetro basal de brote. Puede observarse que el valor de $F = 0.0001 < \alpha = 0.05$, lo que indica que no todas las variedades evaluadas tienen el mismo ritmo de crecimiento en diámetro basal en cada una de las fechas muestreadas.

El análisis de varianza para la variable respuesta diámetro basal (Anexo 4), indica que hubo diferencias significativas en esta variable ($\alpha = 0.05$), lo que indica que no en todas las variedades evaluadas existe la misma respuesta de crecimiento en el diámetro basal de los brotes ante condiciones ambientales y labores de cultivo semejantes (figura 5).

En la prueba de comparación de medias para la variable incremento en diámetro basal (anexo 4) se observan diferencias significativas entre las variedades, observándose mayor diámetro en la variedad V- 17 (Angelika) y Silver Star respectivamente, en comparación al variedad Supjibi que fue el menor (figura 5). Para este caso las diferencias no son tan marcadas, pero sí se detectaron a nivel estadístico.

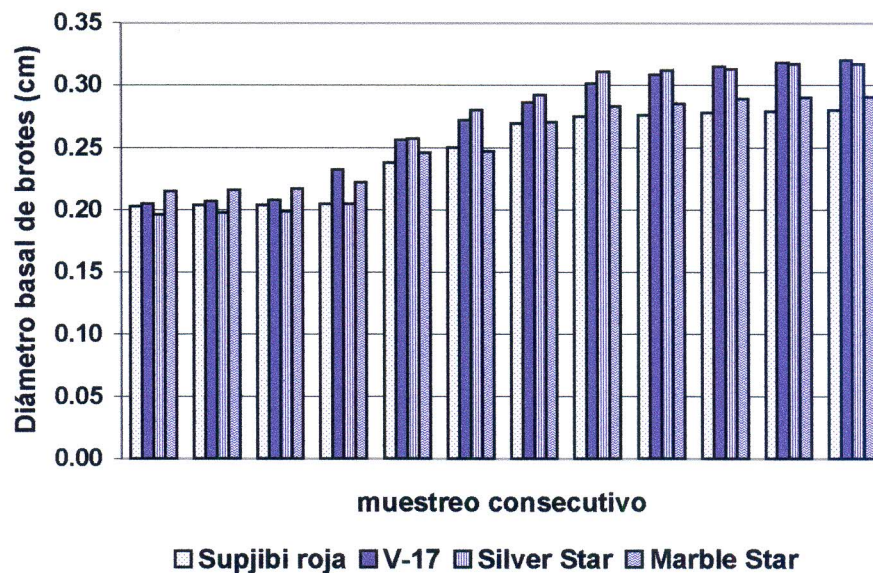


Figura 5. Diámetro basal de brotes en cuatro variedades de nochebuena en Texcoco, México.

Las variedades con mejor respuesta son: V-17 y Silver Star. Las variedades con menor diámetro fueron Supjibi y Marble Star, cuyos diámetros de brotes fueron significativamente menores.

5.1.3 Número de hojas

En el anexo 5 se presenta el análisis de varianza para la variable número de hojas, para cada variedad. El valor de $F = 0.0012 < \alpha = 0.05$, por lo que no todas las variedades evaluadas tienen la misma respuesta en crecimiento en cuanto al número de hojas.

En la figura 6 se muestran los resultados para la variable número de hojas existiendo diferencias significativas entre tratamientos y obteniendo los mejores resultados en la variedad V-17, que en promedio presentó 7 hojas por brote. Se observan diferencias significativas entre variedades. La variedad V-17, obtuvo los mejores resultados (mayor crecimiento) en comparación con las demás variedades.

En el anexo 6 se comparan las medias estadísticas para el número de hojas, observándose diferencias significativas entre tratamientos. La variedad V-17 (Angelika), obtuvo el número total de hojas mayor (9 hojas por brote), en comparación con la variedad Marble Star , variedad que desarrolló un total de 7 hojas por brote.

De manera general, las variedades V -17 y Supjibi presentaron una tendencia de mayor crecimiento al final de los muestreos, al final la variedad Supjibi fue la que mostró un mayor crecimiento.

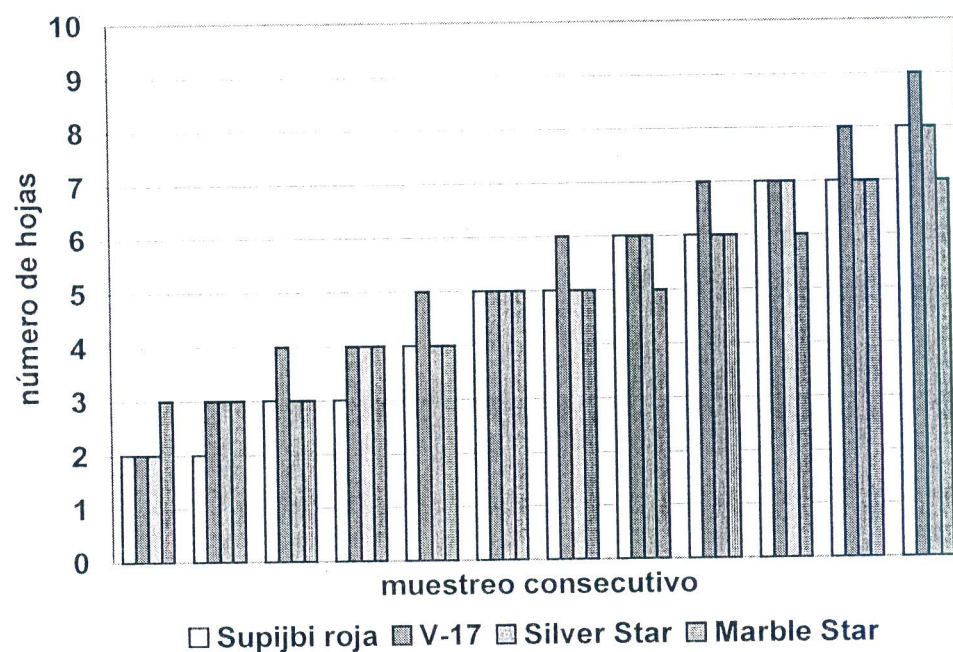


Figura 6. Número de hojas por brote en cuatro variedades de nochebuena en Texcoco, México.

5.2 Cuantificación de Pigmentos

5.2.1 Concentración de clorofila

En el cuadro 6 se muestra la concentración de clorofila encontrada para cada variedad.

Cuadro 6. Contenido promedio de clorofila en hojas de cinco variedades de nochebuena ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

VARIEDAD	CLOROFILA a	CLOROFILA b	CLOROFILAS TOTALES
Silver Star	0.833	0.694	1.526
Supjibi rosa	1.009	0.688	1.698
Supjibi roja	1.950	0.686	2.652
Marble Star	1.216	0.694	1.911
V-17 Angelika	1.424	0.6825	2.107

Como puede apreciarse, la variedad con mayor contenido de clorofilas a, b y totales fue la variedad Supjibi roja; le sigue la variedad V-17. Puede observarse que la proporción de clorofila b es más o menos constante para todas las variedades (0.68-0.69 mg/g), mientras que varía la proporción de clorofila a. En el caso de la variedad Supjibi Roja la proporción clorofila a : clorofila b llega a ser de 3, y de 2 para las variedades Marble Star y Angelika. Así, el mayor contenido de clorofila a en hojas de Supjibi podría estar relacionado con la tonalidad más oscura de las mismas.

5.2.2 Cuantificación e identificación de antocianinas por HPLC en brácteas y hojas de transición

En la figura 7 se muestra el cromatograma para los estándares de pelargonidina, cianidina y malvidina. Para el caso de la delphinidina, aunque no se cuenta con el cromatograma se muestran los resultados de identificación en el cuadro 7.

Cuadro 7. Descripción del cromatograma para el estándar de delphinidina 3-glucósido

Tiempo de retención (min)	Area (mAU*s)	Area (%)
8.462	2560.622	94.0799
8.252	2824.118	94.8869

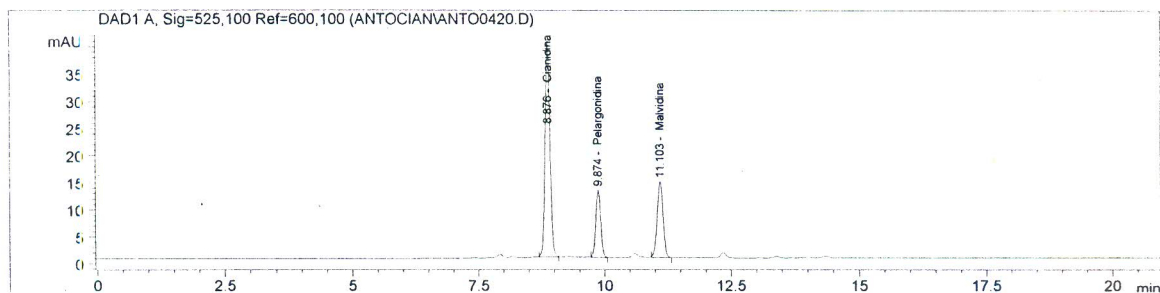


Figura 8. Cromatograma de antocianinas estándar (Cianidina, Pelargonidina y Malvidina)

En las cinco variedades de nochebuena analizadas se detectaron diez tipos de antocianinas distintas. Entre estas se encuentra la delfinidina, cianidina, pelargonidina y malvidina. El resto de las antocianinas no se identificaron por lo que se les asignaron las letras A, B, C, D, E y F, según su tiempo de retención. Se muestran a continuación los cromatogramas obtenidos para cada variedad, donde puede observarse la proporción de las antocianinas detectadas. En la mayoría de los casos hubo diferencias significativas entre los tiempos de retención para cada antocianina ($P < 0.05$) No así con sus correspondientes estándares, para los cuales no hubo diferencias significativas en los tiempos de retención de cada antocianina ($P > 0.05$).

En las brácteas de la variedad Supjibi roja se encontraron nueve diferentes tipos de antocianinas, de las cuales la cianidina y la antocianina B ocuparon cada una alrededor del 30 % del área (figura 8). La pelargonidina, delfinidina y antocianina D ocuparon áreas cercanas al 10 %. Cabe resaltar que ‘Supjibi Roja’ es la única variedad en la que se detectaron las antocianinas A y C, aunque con proporción menor al 1 % (cuadro 8). La antocianina E se presentó sólo en brácteas de las variedades Supjibi Roja y Freedom.

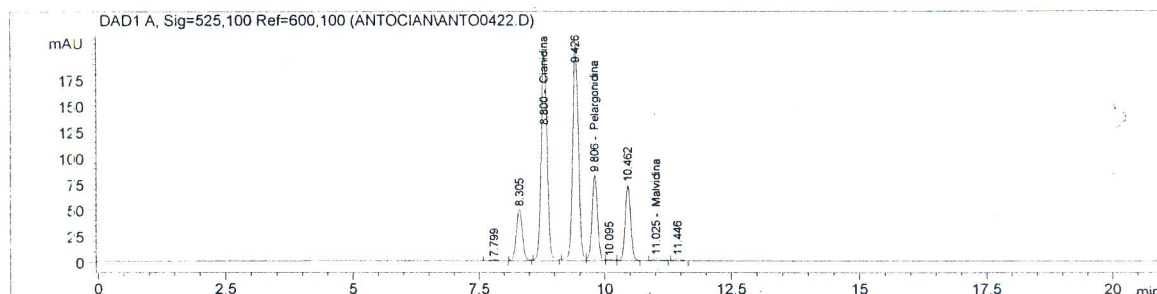


Figura 8. Cromatograma de antocianinas en brácteas de ‘Supjibi Roja’

Cuadro 8. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de 'Supjibi Roja'						
Variedad Supjibi Roja. Brácteas						
Número	Tiempo de retención (min)	Tipo	amplitud (min)	Área (mAU*S)	Área %	Nombre
1	7.799	PB	0.1751	12.78999	0.02566	A
2	8.305	BB	0.1317	421.94193	8.4658	Delfinidina
3	8.8	BB	0.1276	1636.71924	32.8388	Cianidina
4	9.426	BV	0.1235	1661.39319	33.3338	B
5	9.806	VV	0.1197	631.74188	12.6751	Pelargonidina
6	10.095	VV	0.1465	14.08346	0.2826	C
7	10.462	VB	0.1172	557.03241	11.1762	D
8	11.025	BB	0.1615	26.54834	0.5327	Malvidina
9	11.446	BB	0.1359	21.85324	0.4385	E
TOTAL :				4984.10369		

En las hojas de transición de Supjibi Roja se presentó un comportamiento similar: la antocianina B siguió guardando mayor proporción (43.46 %) junto con la cianidina (26.2%) (cuadro 9). La delfinidina y antocianina D guardaron proporciones cercanas al 10 %, bajando la proporción de pelargonidina . El contenido de malvidina fue muy bajo en ambos casos, no obstante fue tres veces más abundante en las hojas de transición que en las Brácteas (figuras 8 y 9).

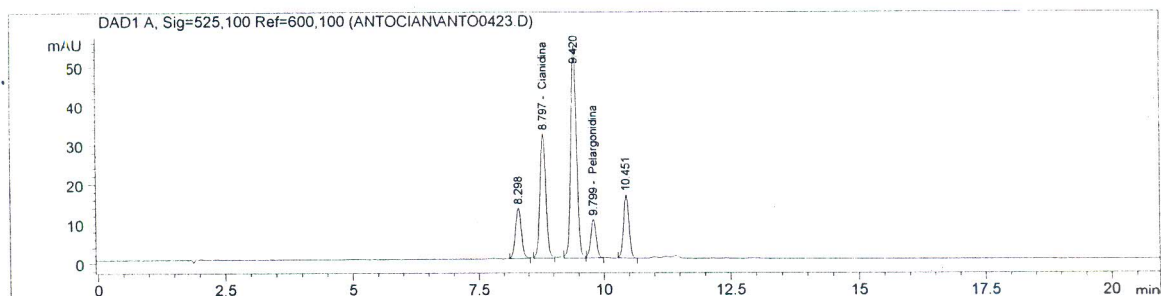


Figura 9. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de Supjibi Roja

**Cuadro 9. Descripción del cromatograma de antocianinas para
hojas de transición en 'Supjibi Roja'**

Variedad Supjibi Roja. Hojas de Transición						
Número	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Amplitud (min)	Area (mAU*S)	Area %	Nombre
1	8.298	BB	0.1305	107.71882	10.8782	Delfinidina
2	8.797	BB	0.1279	259.42966	26.199	Cianidina
3	9.42	BB	0.1229	430.39267	43.4641	B
4	9.799	BB	0.1162	73.75727	7.4485	Pelargonidina
5	10.451	BB	0.1171	118.92708	12.0101	D
6	11.03	VV	0.1179	12.94507	1.4488	Malvidina
TOTAL :				990.22549		

En la variedad Supjibi Rosa se detectaron sólo seis tipos de antocianinas, estando ausentes las antocianinas A, C, E y F (figura 10). La cianidina fue el pigmento de mayor proporción tanto en brácteas (38 %) como en hojas de transición (49 %) (figuras 10 y 11). El segundo pigmento más abundante fue la pelargonidina que se presentó en proporción de alrededor del 25 % para ambos casos (cuadros 10 y 11).

La malvidina se presentó sólo en brácteas de 'Supjibi Rosa' en proporción de 0.5 %. En hojas de transición éste pigmento estuvo ausente. La proporción de las antocianinas B y D en hojas de transición fue de la mitad en comparación a su proporción en brácteas. Mientras que el contenido de Delfinidina, aunque fue semejante en ambos casos, fue más bajo en Brácteas (cuadros 10 y 11).

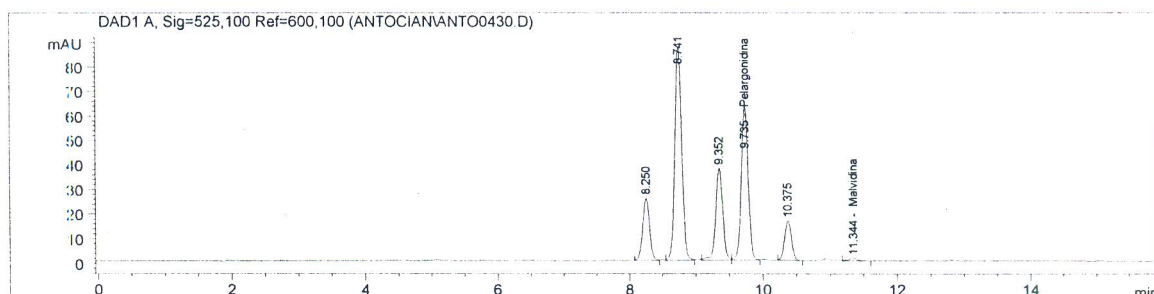


Figura 10. Cromatograma de antocianinas en brácteas de 'Supjibi Rosa'

Cuadro 10. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de ‘Supjibi Rosa’

Variedad Subjibi Rosa. Brácteas						
Número	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Amplitud (min)	Área (mAU*S)	Área %	Nombre
1	8.25	BB	0.1122	181.62822	11.0084	Delfinidina
2	8.741	BB	0.1118	626.49957	37.972	Cianidina
3	9.352	BV	0.1138	274.52219	16.6387	B
4	9.735	VB	0.1109	445.34784	26.9924	Pelargonidina
5	10.375	BP	0.1102	112.59825	6.8246	D
6	11.344	BP	0.1332	9.30307	0.5639	Malvidina
TOTAL :				1649.89914		

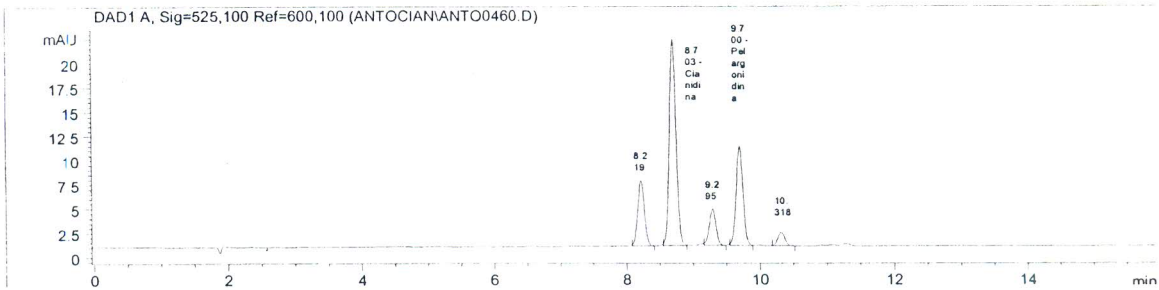


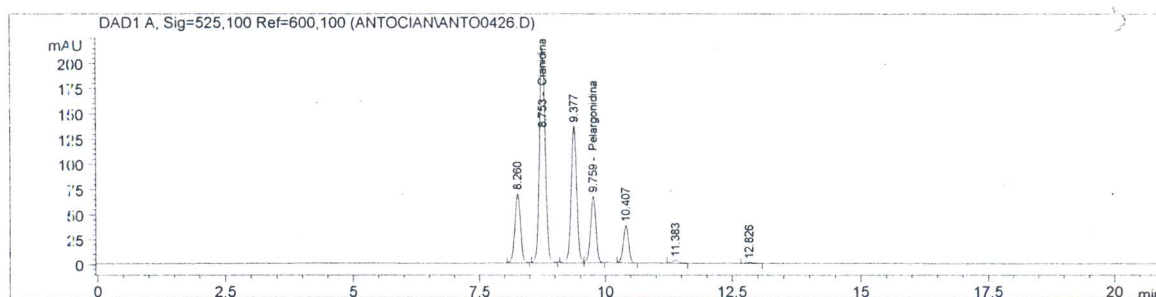
Figura 11. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de ‘Subjibi Rosa’

Cuadro 11. Descripción del cromatograma para antocianinas en hojas de transición de ‘Supjibi Rosa’

Tiempo de Retención (min)						
Número	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Amplitud (min)	Area (mAU*S)	Area %	Nombre
1	8.242	BP	0.1163	53.65382	15.3829	Delfinidina
2	8.74	BB	0.1164	170.62599	48.9194	Cianidina
3	9.355	BB	0.116	29.3815	8.4238	B
4	9.741	BB	0.1096	83.78	24.0202	Pelargonidina
5	10.382	PP	0.1133	11.34837	3.2536	D
6	11.077		0	0	0	Malvidina
TOTAL :				348.78968		

En la variedad Freedom se encontró la antocianina F, exclusiva de esta variedad y sólo en brácteas (cuadro 12, figura 12). La cianidina y antocianina B fueron las más abundantes (41% y 25.7 % respectivamente). La delfinidina, pelargonidina y antocianina D se presentaron en proporciones cercanas al 10 %, su proporción no varió mucho en las hojas de transición en comparación con las brácteas, aunque cabe hacer notar que la proporción de antocianina B y delfinidina aumentaron en las hojas de transición y disminuyó la pelargonidina en comparación con las brácteas. (cuadros 12 y 13, figuras 12 y 13).

Figura 12. Cromatograma de antocianinas en brácteas de 'Freedom'



Cuadro 12. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de 'Freedom'.

Variedad Freedom brácteas						
Número	Tiempo de Retención (min)	Tipo	Amplitud (min)	Area (mAU*S)	Area %	Nombre
1	8.26	BB	0.122	548.89264	13.4439	Delfinidina
2	8.753	BB	0.1208	1673.29089	40.9836	Cianidina
3	9.377	BV	0.1179	1050.94153	25.7405	B
4	9.759	VB	0.1165	497.79605	12.1924	Pelargonidina
5	10.407	PP	0.1152	276.75458	6.7785	D
6	11.224	VB	0.1211	26.70118	0.5519	Malvidina
7	11.383	BB	0.1275	25.50472	0.6247	E
8	12.826	PB	0.1303	9.64976	0.2363	F
TOTAL :				4082.83017		

Cuadro 13. Descripción del cromatograma para antocianinas en hojas de transición de 'Freedom'

VARIEDAD FREEDOM HOJA BANDERA					
Número	RetTime	Type	Width (min)	Area (mAU*S)	Area %
1	8.169	BB	0.1044	367.90503	16.7063
2	8.649	BB	0.1062	857.55219	38.9409
3	9.241	BB	0.1073	683.26221	31.0265
4	9.645	BB	0.1112	157.36818	7.146
5	10.262	VB	0.109	124.12363	5.6364
6	11.223	VB	0.1223	11.97654	0.5438
TOTAL :				2202.18777	

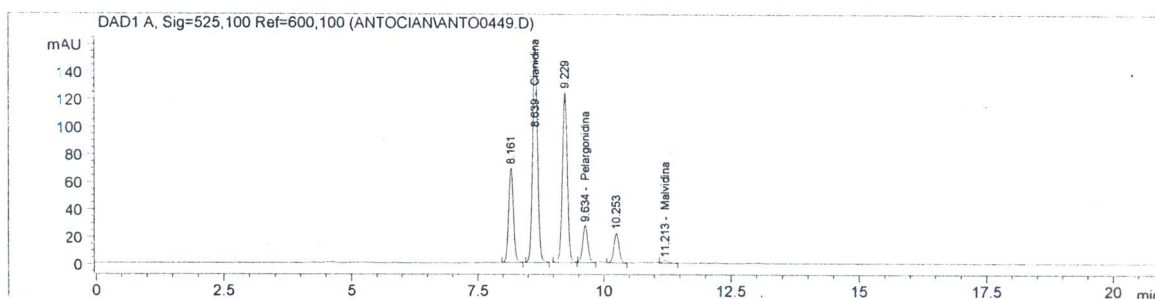


Figura 13. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de 'Freedom'

En la variedad Silver Star cinco antocianinas estuvieron presentes, cuatro de ellas en mayor proporción: pelargonidina (35%), cianidina y antocianina D (21 y 20 %) y antocianina B (18%). En esta variedad la malvidina estuvo ausente. En comparación a las brácteas, las hojas de transición de 'Silver Star' presentaron mayor concentración de cianidina pero menor proporción de antocianinas B y D (figuras 14 y 15; cuadros 14 y 15).

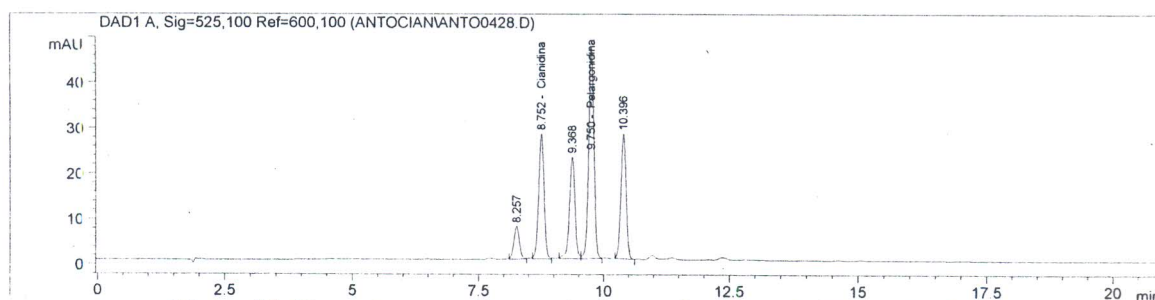


Figura 14. Cromatograma de antocianinas en brácteas de 'Silver Star'.

Cuadro 14. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas de 'Silver Star'.

Variedad Silver Star. Brácteas						
Número	RetTime	Tipo	Amplitud (min)	Area (mAU*S)	Area %	Nombre
1	8.257	BB	0.12	55.93741	5.7223	Delfinidina
2	8.752	BB	0.116	207.26456	21.2029	Cianidina
3	9.368	BV	0.1203	173.29782	17.7281	B
4	9.75	VB	0.1137	340.86282	34.8698	Pelargonidina
5	10.396	BP	0.1131	200.16748	20.4769	D
6	11.103		0	0	0	Malvidina
TOTAL :				977.53009		

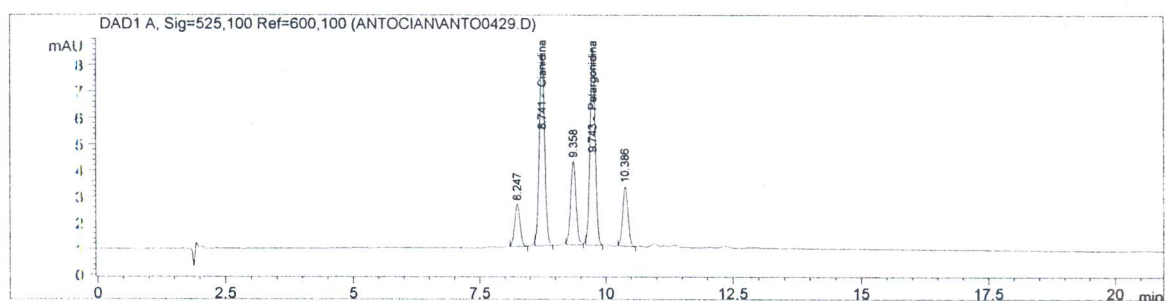


Figura 15. Cromatograma de antocianinas en hojas de transición de 'Silver Star'

Cuadro 15. Descripción del cromatograma para antocianinas en hojas de transición de 'Silver Star'

Variedad Silver Star. Hojas de transición.						
Número	Tiempo de retención	Tipo	Amplitud (min)	Area (mAU*S)	Area %	Nombre
1	8.247	BP	0.1167	12.11602	7.5174	Delfinidina
2	8.741	BB	0.1168	54.52361	33.8294	Cianidina
3	9.358	BB	0.1155	24.04572	14.9193	B
4	9.743	BB	0.1118	53.79487	33.3773	Pelargonidina
5	10.386	BP	0.113	16.69204	10.3566	D
6	11.077		0	0	0	Malvidina
TOTAL :				161.17226		

Como se puede observar en las hojas de transición de la variedad Silver Star se encuentran hasta cinco diferentes tipos de antocianinas, de las cuales tres se manifiestan con mayor área, destacándose la cianidina y la pelargonidina, disminuyendo la antocianinas A y B (desconocidas) y algo importante no se encuentra la malvidina.

En las brácteas y en hojas de transición en variedad V-17 Angelika, no se detectó ningún tipo de antocianinas. (cuadro 16).

Cuadro 16. Descripción del cromatograma para antocianinas en brácteas y hojas de transición de 'V-17 Angelika'

Variedad V-17 Angelika. Brácteas y hojas de transición.					
Número	Tiempo de Retención (min)	Tipo Amplitud (min)	Area (mAU*S)	Area %	Nombre
1	8.986	0	0	0	Cianidina
2	9.8	0	0	0	Pelargonidina
3	11.077	0	0	0	Malvidina
TOTAL :			0		

En el cuadro 17 se comparan las proporciones de antocianinas en cada variedad. Haciendo un análisis comparativo entre todas las variedades no se encontró una correspondencia proporcional entre clorofilas totales y la presencia de antocianinas en brácteas y en hoja de transición. Las variedades que presentaron mayor concentración de clorofilas totales no siempre fueron las variedades de brácteas rojas.

Las variedades rojas presentaron hasta 9 tipos de antocianinas, siendo tres de ellas (A, C y F) exclusivas para una sola variedad. Los cuatro pigmentos de mayor concentración en las variedades rojas (ó vivas) y rosas (ó pálidas) fueron: las antocianinas B, cianidina, antocianina D y pelargonidina.

Cuadro 17. Antocianinas detectadas por variedad.

INTERVALO DE RETENCIÓN (MIN)	ANTOCIANINA	ÁREA OCUPADA POR VARIEDAD (%)									
		Suj-Br	Suj-Ht	Fr-Br	Fr-Ht	Sus-Br	Sus-Ht	SS-Br	SS-Ht	V17-Br	V17-Ht
7.80	A	0.026	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8.30	Delfinidina	8.466	10.878	13.444	16.706	11.008	15.383	5.722	7.517	0.000	0.000
8.80	Cianidina	32.839	26.199	40.984	38.941	37.972	48.919	21.203	33.830	0.000	0.000
9.43	B	33.334	43.464	25.740	31.026	16.639	8.424	17.728	14.919	---	---
9.81	Pelargonidina	12.675	7.448	12.192	7.146	26.102	24.020	34.870	33.377	0.000	0.000
10.09	C	0.283	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10.46	D	11.176	12.010	6.778	5.636	6.825	3.254	20.480	10.357	---	---
11.02	Malvidina	0.533	1.449	0.552	0.544	0.564	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11.45	E	0.485	---	0.625	---	---	---	---	---	---	---
12.83	F	---	---	0.236	---	---	---	---	---	---	---

Suj=Supjibi Roja, Fr=Freedom, Sus=Supjibi Rosa, SS=Silver Star, V17=V-17 Angelika, Br=bráctea, Ht = hoja de transición.

Estuvieron presentes en todas las variedades pigmentadas: la delfinidina, cianidina, antocianina B, pelargonidina y antocianina D. Es notable que la malvidina estuvo ausente en la variedad blanca. La delfinidina se presentó en proporciones entre 5 y 16 % en brácteas, y esta proporción aumentó en las hojas de transición para todas las variedades.

La cianidina fue la antocianina de mayor proporción en todas las variedades ocupando entre el 21 y 49 % de las antocianinas totales. Su concentración fue mayor en brácteas que en hojas de transición en las variedades con colores rojos vivos ('Supjibi Roja' y 'Freedom'), mientras que en las variedades con colores pálidos ('Supjibi Rosa' y 'Silver Star') la proporción de cianidina fue mayor en las hojas de transición.

La pelargonidina mostró una proporción mayor en las variedades pálidas ('Silver Star' y 'Supjibi Rosa') en comparación a las de colores vivos ('Freedom' y 'Supjibi Roja'). Aunque siempre hubo una mayor cantidad de pelargonidina en brácteas, que en hojas de transición. Estos resultados coinciden con los encontrados en *Pelargonium* donde el pigmento de mayor impacto para la coloración roja es precisamente la pelargonidina (Mitchell *et al.*, 1997).

La malvidina estuvo presente en las variedades Supjibi Roja, Freedom (de colores vivos) y en 'Supjibi Rosa'; en ésta última sólo en las brácteas. Su mayor concentración se encontró en brácteas de 'Supjibi Roja' (1.5 %). En los demás casos su proporción fue constante (igual al 0.5 %), siendo la antocianina de más baja proporción. Esto hace suponer que si bien la presencia de malvidina es un elemento determinante en la pigmentación para las variedades rojas, la coloración roja no depende de la concentración este pigmento, pero sí de su presencia.

La antocianina designada con la letra B, presente en todas las variedades pigmentadas, guardó proporciones semejantes a las de la cianidina y pelargonidina (entre 8 y 43 %). Su proporción aumentó en las hojas de transición en comparación con las brácteas en las variedades de colores vivos ('Supjibi Roja' y 'Freedom'), mientras que en las variedades pálidas este fenómeno fue al revés (su proporción fue mayor en brácteas).

Las proporciones que presentó el pigmento B dejan ver que esta antocianina cuenta para la coloración roja y su intervención, en el caso de las variedades de nochebuena aquí analizadas, puede ser aún más decisivo que el papel de la pelargonidina debido a las concentraciones que ambas presentan. No obstante su comportamiento en las variedades de color rojo vivo se encontró en mayor proporción en hojas de transición y no en brácteas. Posiblemente ayude en el proceso de pigmentación y disminuya conforme este proceso madura.

La antocianina designada con la letra D, presente también en todas las variedades pigmentadas, guardó proporciones menores (entre 3 y 20 %). En las variedades pálidas (Supjibi Rosa y Silver Star) su proporción en brácteas fue del doble en comparación a las de hojas de transición, mientras que en las variedades de colores vivos esta proporción se mantuvo sin variaciones importantes, tanto en hojas de transición como en brácteas.

Los niveles de cianidina fueron mayores (del 21 al 48 %) en comparación a los de la pelargonidina y malvidina en todas las demás variedades (Supjibi Roja, Freedom y V-17

Angelika). La pelargonidina ocupa el segundo lugar en concentración, ocupando un área de 7 % en las hojas de transición en las variedades rojas y del 12 % en las Brácteas rojas. Estos porcentajes se incrementaron a niveles de 26 al 33 % en las variedades Supjibi Rosa y Silver Star.

A diferencia de los resultados obtenidos por Banerji y Sharma (1979), en que encontraron una proporción de 2:1 en el contenido de Cianidina: Pelargonidina, las Brácteas y hojas de transición de la variedad Supjibi y Freedom presentaron una proporción de casi 3:1 de estos pigmentos. En la variedad Supjibi Rosa esta proporción bajó a 2:1.

Analizando e cuadro 16 se encontró que los pigmentos A y C fueron exclusivos de la variedad Supjibi Roja. El pigmento E se presentó en Supjibi Roja y Freedom. El pigmento F se presentó sólo en la variedad Freedom. Sin embargo, los porcentajes de estos cuatro pigmentos son mínimos con respecto al resto (entre 0.02 a 0.5 %), por lo que se infiere que poco intervienen en la coloración roja. Tal vez intervengan en la tonalidad.

VI. CONCLUSIONES

1. Para las condiciones de Texcoco las variedades Supjibi y V-17 Angelika presentaron el mayor crecimiento en cuanto a longitud, diámetro y número de hojas.
2. No existe una relación directa entre el color verde de las hojas con la pigmentación roja de las brácteas.
3. La tonalidad más verde en las hojas es debida al contenido de clorofila a.
4. Se detectaron diez tipos de antocianinas distintos. Entre estos la delfinidina, cianidina, pelargonidina y malvidina y seis tipos de antocianinas de las cuales se desconoce el nombre.
5. La variedad V-17 Angelika carece de antocianinas.
6. La pigmentación en brácteas de nochebuena, independientemente de la variedad es debida a cuatro antocianinas: 'B', cianidina, 'D' y pelargonidina.
7. La presencia de malvidina es un elemento determinante en la pigmentación para las variedades rojas. La coloración roja no depende de la concentración de este pigmento, pero sí de su presencia.
8. Debido a las proporciones más altas de cianidina y pelargonidina en las variedades pigmentadas, podría considerárseles, junto con la antocianina B como las responsables de la coloración roja en las variedades analizadas de *Euphorbia pulcherrima*.

VII. RECOMENDACIONES

Para estas variedades se sugiere un estudio más detallado de la relación que existe entre el contenido de clorofila a y la presencia de antocianinas en brácteas y en la hoja de transición.

Sería interesante la identificación de las antocianinas que restan, así como hacer un seguimiento de la proporción que guardan todas las antocianinas durante el proceso de pigmentación.

Se recomienda hacer un estudio comparativo en una sola variedad de *Euphorbia pulcherrima* cuya floración y pigmentación sean inducidas en un caso, y en otro, se inhiba el proceso de pigmentación de Brácteas mediante el manejo del fotoperíodo.

VIII. LITERATURA CITADA

- Alpi, A. Togonif. 1987. Cultivo en invernadero. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 254 p.
- Asen, S. 1958. Anthocyanins in bracts of *Euphorbia pulcherrima* as revealed by paper chromatographic and spectrophotometric methods. *Plant Physiology*. 33:14-17.
- Asen, S. 1979. Flavonoid Chemical Markers in Poinsettia Bracts. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:223– 226.
- Banerji, D. y V. Sharman.. 1979. Parallelism in Hill and anthocyanidin content in *Euphorbia pulcherrima*. *Phytochemistry*. 18(10):1767-1768.
- Barnes, L., Drees B., Hall C. y D. Wilkerson. 1996. The poinsettia manual. Don Wilkerson (Ed.). Texas Agricultural Extension Service College Station Texas. Dirección en Internet:
<http://aggiehorticulture.tamu.edu/greenhouse/guides/poinsettia/index.html>
- Bidwell, R.G.S. 1990. Fisiología vegetal. A.G.T. Editor. México, D.F. 783 p.
- Buchanan, B. B., W. Grulsem y R. L. Jones. 2005. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Am. Soc. Plant Physiologist, Rockville, Me. E. U. A. 1366 p.
- Carrichael, J. L. 1990. Manual de Nochebuena. Plantec. No. 4. Amacuzac, Morelos. 23 p.
- Davies, K. M. y K. E. Schwinn. 1997. Flower color. In: Geneve, R. L. J. E. Prece y S. A. Merkle (eds.) Biotechnology of ornamental plants. CAB International Press U. K. p. 259-294.
- Devlin, R. M. 1990. Fisiología vegetal. Omega S.A. Barcelona, España. 517 p.
- Ecke, P. Jr. y O. A. Matkin. 1976. The poinsettia manual. Paul Ecke Poinsettias. Encinitas, Cal. U.S.A. 258 p.

- Faust, J. E y R. D. Heins. 1996. Axillary bud development of poinsettia 'Eckespoint Lilo' and 'Eckespoint Red Sails' (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) is inhibited by high temperatures. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121(5) :920-926.
- Francis, F. J. 1982. Analysis of anthocyanins: anthocyanins as food colors. Acad. Press. New York.
- Galston, A. W. y P. J. Davies. 1970. Control mechanisms in plant development. Foundations of Developmental Biology Series. Prentice-Hall, Inc. U.S.A. 184 p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana.) Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 2ª ed. México, D. F. 217 p.
- Grueber, K. L. 1985. *Euphorbia pulcherrima*. Crc in handbook of flowering., V.1. Crc Press. Inc. Boca Ratón, Florida, U.S.A. pp.488-495.
- Harborne, J. B. 1958. Spectral methods of characterizing anthocyanins. Biochem. J. 70:22-28.
- Harrison, A. D. 1967. Producción comercial de flores y follaje ornamental en invernaderos. Manuales técnicos agropecuarios. Editorial Acriba. Madrid, España. pp. 22-30.
- Heldt, H. W. 1997. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press. New York. E. U. A. 522 p.
- Holcomb, E. J., Lee C. y R. Berhage. 1996. Interaction of dif and irrigation method on poinsettia. Bulletin -pennsylvania-flower-growers. 437:1-2.
- Jordan, B. R. 1993. The molecular biology of flowering. C.A.B. International. 265 p.
- Kannangara, C. G. y Hansson, M. 1998. Arrest of chlorophyll accumulation prior to anthocyanin formation in *Euphorbia pulcherrima*. Plant. Physiol. Biochem. 36(12):843-848.

- Kofranek, A. M. y W. P. Hackett. 1965. The influence of daylight and night temperature on the flowering of poinsettia, cultivar 'Paul Mikkelsen'. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 87:515-520.
- Larson, R. A., Love, J. W., Strider, D. L., Jones, R. K., Baker, J. R. y K. F. Horn. 1978. N. C. State Univ. Agric. Ext. Serv. Bull. 108:44.
- Larson, R. A. 1988. Introducción a la Floricultura. AGT. Editor, S.A. 2ª. ed. México, D. F., 551 p.
- Lawrence, W. J. C., Price, J. R., Robinson, G. M. y R. Robinson. 1941. The distribution of anthocianins in flowers fruits and leaves. Proc. Roy. Soc. (London) (Philosophical Transactions)B230:149-172.
- Liu-bin, Henis R., Liu-bin. D. y Marcelis I. F. M. 1998. Modeling poinsettia vegetative growth and development: the response to the ratio of radiant to thermal energy. Second international symposium on models for plant growth, environmental control and farm management in protected cultivation. Wageningen, Netherlands. 25-28 August 1997. Acta-Horticulturae. 456:133-142.
- Markham, K. R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic press. Londres. p 15.
- Marousky, F. J. 1968. Determination of poinsettia cyanidin and pelargonidin by differential absorbtimetry. American society for horticultural science 92:672-677.
- Martinez, F. 1995. Manual práctico de producción de nochebuena. Consultora Oasis. Jiutepec, Morelos, México. 87 p.
- Mayer, S. B et al. 1966. Introducción a la fisiología vegetal. Editorial universitaria de Buenos Aires, Argentina. 569 p.
- Medina, J. J. A. 1991. La empresa Mexfipel, S. A. de C. V. como un ejemplo de la rentabilidad económica y factibilidad técnica de la hidroponia en geranio (*Pelargonium* sp.) y nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* W.). Tesis profesional de Ing. Agrónomo e especialista en fitotecnia. Departamento de fitotecnia. UACh, Chapingo, México.

- Mejía Muñoz J. M. Espinosa Flores A. 2003. Especies Fotoperiódicas Mexicanas En: Mejía Muñoz J. M. Espinosa Flores A. (comp.) Plantas nativas de México con potencial ornamental. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. P 159-166.
- Milthope, F. L. y Moorby J. 1982. Introducción a la fisiología de los cultivos. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 259 p.
- Mitchell, K. A., Markham K. R. y M. R. Boase. 1998. Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers. *Phytochemistry* 47(3):355-361.
- Pérez, García F. y Martínez-Laborde J. B. 1994. Introducción a la Fisiología Vegetal. Mundi prensa. Madrid, España 218 p.
- Rojas, Garcidueñas M., Ramírez H. 1991. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Ed. Limusa. México, D.F. 239 p.
- Rojas, H. L. 2003. Contenido y tipo de antocianinas de las variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. Tesis de licenciatura, Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Rzedowski, J. y G. C. de Rzedowski, (eds.) 1990. Flora fanerogámica del Valle de México V. III. Instituto de Ecología. Pátzcuaro Michoacán, México.
- Saldaña, S. E. 1992. El cultivo de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) En la zona de Xochimilco, D.F. Tesis profesional. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México. 58 p.
- Salinas, M., Y. 2000. Antocianinas en grano de maíces criollos mexicanos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México.
- Salisbury, F. B. Y Ross, C. W. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. 4ª Ed. México D.F. 759 p.
- Saunders, J. A. y J. M. McClure. 1972. *Am. J. Botany* 59:673

- Sauser, H. y Hentze C. 1997. Cool morning reduces height and width of poinsettias. *Taspo-Gartenbaumagazin*. 6 (8):41-43.
- Semeniuk, P. y Griesbach R.J. 1985. Bud applications of butyric acid induces branching of a nonbranching poinsettia. *HortScience* 20:120-121.
- Stewart, R. N. y T. Arisumi. 1966. Genetic and histogenic determination of pink bract color in poinsettia. *The Journal of Heredity*. 57(6):217-222.
- Stewart, R. N., Asen, S., D. R. Massie y K. H. Norris. 1980. The anthocyanin and flavonol composition of three families of poinsettia color sports. *The Journal of Heredity*. 71:140-142.
- Struckmeyer, B. E. y G. E. Beck. 1970. Flower Bud Initiation and Development in Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd..) *Proc. Am. Soc. Hort. Science*. 75:730-738.
- Sutcliffe, J. 1977. Las plantas y el agua. Omega S.A. Barcelona, España.
- Villegas, R. M. L. 1998. Determinación del número de noches largas necesarias para inducir la floración y pigmentación de brácteas en el cultivo de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) cv. Supjibi. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 94 p.
- Villegas, T. O. 1990. Efecto del paclobutrazol (bonzi-pp333), sobre nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* W.) cv. Gutbier v-10, bajo condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México. 84 p.
- Wieland, C. E., Barrett J. E., Nell T. A. y D. G. Clark. 2000. Floral initiation in *Euphorbia pulcherrima* at night temperatures. *Acta Hort*. 515:213-217.

Anexo 1. VARIABLE 'LONGITUD DE BROTES'

Medias de longitud de los brotes (cm) para cada cultivar.

MUESTREOS	SUPJIBI	V-17	SILVER STAR	MARBLE STAR
1	0.3	0.8	0.6	0.3
2	1.1	1.6	1.4	0.8
3	2.4	3.4	2.8	2.2
4	5.5	6.6	5.1	4.9
5	7.4	8.8	8.1	7
6	19	17.8	18.2	16.1
7	21.1	19.3	19.8	17.3
8	23.1	24.3	22.4	19.1
9	24.6	25.6	23.1	20.4
10	25.5	27.3	26	23.6
11	26	27.9	26.8	24
12	26.4	28.6	27.3	24.5
13	27.1	29.1	28.3	25.6
14	27.6	29.3	28.6	26.1
15	28.4	31.1	29.2	27
16	30.4	31.8	29.8	27.6
17	32	32	30	27.7
18	32.6	32.2	30.1	27.8
19	33	32.4	30.3	28.2
20	34.1	32.6	30.8	28.6
21	34.8	33	31	28.8
22	36.1	33.4	31.3	29
23	36.5	33.5	31.4	29.2
24	37	33.6	31.5	30
25	37	33.6	31.5	30

Anexo 2. Análisis de Varianza para la variable 'Longitud de brote'.

FV	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEAN SQUARE	F VALUE	PR >
F					
Modelo	27	11543.31760000	427.53028148	293.16	0.0001
Error	72	105.00200000	1.45836111		
Corrected Total	99	11648.31960000			
R-Square	C.V.	Root MSE	Y Mean		
0.990986	5.205734	1.207626	23.19800000		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FECH	25	11356.27960000	473.17831667	324.46	0.0001
VAR	4	187.03800000	62.34600000	42.75	0.0001

F.V = Fuentes de variación; G.L = Grados de libertad; C.V % = Coeficiente de variación; R² = Coeficiente de ajuste al modelo

Anexo 2. Comparación de medias para la variable 'longitud de brote'

TUKEY	GROUPING	MUESTREO	CULTIVAR
A	24.3840	25	V-17
A			
A	24.3600	25	supjibi
B	23.0160	25	silver star
C	21.0320	25	marble star

Alpha= 0.05 df= 72 MSE= 1.458361

Critical Value of Studentized Range= 3.719

Minimum Significant Difference= 0.8983

Anexo 3. Valores promedio de diámetro basal de brotes por cultivar (cm).

MUESTRO	SUPJIBI	V-17	SILVER STAR	MARBLE STAR
1	0.203	0.205	0.196	0.215
2	0.204	0.207	0.198	0.216
3	0.204	0.208	0.199	0.217
4	0.205	0.232	0.205	0.222
5	0.238	0.256	0.257	0.246
6	0.250	0.272	0.280	0.247
7	0.269	0.286	0.292	0.270
8	0.275	0.301	0.311	0.283
9	0.276	0.308	0.312	0.285
10	0.278	0.315	0.313	0.289
11	0.279	0.318	0.317	0.290
12	0.280	0.320	0.317	0.291

Anexo 4. Análisis de varianza para la variable 'diámetro basal de brotes'

F.V.	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F VALUE	PR > F
Model	47	0.24469775	0.00520634	90.68	0.0001
Error	96	0.00551200	0.00005742		
Corrected Total	143	0.25020975			
R-Square	C.V.	Root MSE	Y Mean		
0.977970	2.933277	0.07577	0.25920833		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FECH	11	0.2223142	0.02021031	351.99	0.0001
VAR	3	0.0105125	0.00350708	61.08	0.0001

F.V = Fuentes de variación; G L = Grados de libertad; C. V % = Coeficiente de variación; R^2 = Coeficiente de ajuste al modelo; Variable: Longitud del brote 1 (BL).

Anexo 4. Análisis de comparación de Medias
Para la variable Diámetro basal de brotes.

	TUKEY	GROUPING	MUESATREO	CULTIVAR
A	0.269111	12	V-17	
A				
A	0.264917	12	silver star	
B	0.255861	12	marble star	
C	0.246944	12	supjibi	

Alpha= 0.05 df= 96 MSE= 0.000057

Critical Value of Studentized Range= 3.698

Minimum Significant Difference= 0.0047

Anexo 5 Análisis de varianza para la variable 'Número de hojas'

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	14	152.00000000	10.85714286	60.56	0.0001
Error	33	5.91666667	0.17929293		
Corrected Total	47	157.91666667			
R-Square	C.V.	Root MSE	Y Mean		
0.962533	8.398611	0.423429	5.04166667		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FECH	11	148.41666667	13.49242424	75.25	0.0001
VAR	3	3.58333333	1.19444444	6.66	0.0012

F.V = Fuentes de variación

G.L = Grados de libertad

C.V % = Coeficiente de variación

R² = Coeficiente de ajuste al modelo

Variable: Número de hojas (NH).

Anexo 6. Número de hojas por cada cultivar en 12 muestreos.

MUESTREOS	SUPJIBI	V-17	SILVER STAR	MARBLE STAR
1	2	2	2	3
2	2	3	3	3
3	3	4	3	3
4	3	4	4	4
5	4	5	4	4
6	5	5	5	5
7	5	6	5	5
8	6	6	6	5
9	6	7	6	6
10	7	7	7	6
11	7	8	7	7
12	8	9	8	7

Anexo 7. Prueba de Tukey para la variable 'Número de hojas'

Tukey	Grouping	muestreo	cultivar
A	5.5000	12	V-17
B	5.0000	12	silver star
B	4.8333	12	sipjibi
B	4.8333	12	marble star

Alpha= 0.05 df= 33 MSE= 0.179293

Critical Value of Studentized Range= 3.825

Minimum Significant Difference= 0.4676