CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA INDUCCIÓN FLORAL Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN EL GÉNERO *Polianthes*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

JAIME DAVID SILVA MORALES

GUADALAJARA, JALISCO, FEBRERO DE 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal y Unidad de servicios analíticos y metrológicos (USAM), en el centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. El cual se ubica en la ciudad Guadalajara, Jalisco. Bajo la asesoría del Dr. Ernesto Tapia C.

El trabajo formo parte del proyecto Fondo mixto CONACYT – Gobierno de Jalisco que apoya el proyecto "Estrategias de conservación *ex situ* y domesticación de especies silvestres del género *Polianthes*" clave: M0010-2012-07-190535.

El autor de la presente tesis fue apoyado por beca CONACYT como parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad.

Agradecimiento al fondo mixto CONACYT-Gobierno de Jalisco proyecto 2008-04-99210 "Fortalecimiento de la Maestría en Ciencia de la Floricultura", programa de nueva creación del CIATEJ.

DEDICATORIA

A mi novia por su apoyo incondicional y fuerza de voluntad

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO 4
ÍNDICE DE CUADROS 7
ÍNDICE DE FIGURAS 8
I. RESUMEN 11
II. ABSTRACT 12
III. INTRODUCCIÓN 13
IV. ANTECEDENTES 15
4.1. GENERALIDADES SOBRE LA GEOFITAS 15
4.2. El género *Polianthes* 15
4.3. ORIGEN Y HÁBITO DE CRECIMIENTO 18
4.3.1. Dinámica del crecimiento de bulbos 21
4.4. DORMANCIA Y VERNALIZACIÓN 21
4.4.1. Dormancia 21
4.4.2. Control hormonal de la dormancia 23
4.4.3. Vernalización 24
4.5. FORZAMIENTO 26
4.6. GIBERELINAS 28
4.6.1. Estructura y biosíntesis 29
4.6.2. Inhibidores de giberelinas 32
4.6.3. Plantas bulbosas y la relación con giberelinas 33
4.6.4. Análisis de giberelinas 36
4.6.5. Papel de las giberelinas en la floración de las geofitas 37
4.7. FLORACIÓN 38
4.7.1. Inducción floral 40
4.7.2. Iniciación floral 42

4.7.3. Organogénesis o diferenciación floral 42
4.7.4. Antesis 43
4.7.5. El meristemo apical y su relación en la floración 43
V. HIPÓTESIS: 45
VI. OBJETIVOS: 46
6.1. OBJETIVO GENERAL 46
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 46
VII. MATERIALES Y MÉTODOS: 47
7.1. Experimento de temperaturas de almacenamiento en *P. tuberosa* 47
7.2. Experimento de temperaturas en una especie silvestre del género *Polianthes* 49
7.3. Variables evaluadas 51
7.3.1. Brotación 51
7.3.2. Desarrollo floral 51
7.4. Análisis de giberelinas por HPLC 53
7.4.1. Extracción y purificación 53
7.4.2. Separación, identificación y cuantificación 57
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 59
8.1. Brotación 59
8.2. Iniciación floral en *Polianthes tuberosa* 60
8.3. Iniciación floral en *Polianthes pringlei* 71
8.4. Caracteres florales en *Polianthes tuberosa* 80
8.5. Giberelinas en *Polianthes tuberosa* 87
8.5.1. Identificación de GA_4 en *Polianthes tuberosa* 89
8.5.2. Identificación de GA_7 en *Polianthes tuberosa* 91
8.6. Giberelinas en *Polianthes pringlei* 94
8.6.1. Identificación de GA_4 en *Polianthes pringlei* 95
8.6.2. Identificación de GA_7 en *Polianthes pringlei* 96
8.7. Efecto combinado de la temperatura y las giberelinas 97

8.8. Comparativo de nivel de giberelinas entre *P. tuberosa* y *P. pringlei* y la relación en la floración y morfología meristemática 99

IX. CONCLUSIONES 101

X. RECOMENDACIONES 102

XI. BIBLIOGRAFÍA 103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución en México de especies silvestres y cultivada del género *Polianthes* con potencial ornamental. 16
Cuadro 2. Algunos experimentos realizados de los efectos de giberelinas con diferentes métodos en *P. tuberosa*. 36
Cuadro 3. Tratamientos aplicados a bulbos de *Polianthes tuberosa*. 47
Cuadro 4. Tratamientos aplicados a bulbos de *Polianthes pringlei*. 49
Cuadro 5. Tiempo y gradiente de fases móviles para identificación de giberelinas en P. *tuberosa* por HPLC. 57
Cuadro 6. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. tuberosa* en el tamaño del meristemo a los 0 dds. 63
Cuadro 7. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. tuberosa* en el tamaño y morfología del meristemo a los 30 dds. 66
Cuadro 8. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. pringlei* a los 0 dds. 72
Cuadro 9. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. pringlei* a los 30 dds. 73
Cuadro 10. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. pringlei* a los 60 dds en el tamaño de los meristemos apicales. 76
Cuadro 11. Efecto del almacenamiento térmico en las características florales en bulbos de *P. tuberosa* 82
Cuadro 12. Tiempo de retención y ecuación de la curva HPLC para cada giberelina 87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperaturas registradas en campo para el cultivo de *P. tuberosa.* 48
Figura 2. Temperaturas registradas en campo para el cultivo de *P. pringlei*.....50
Figura 3. Comparativo de temperaturas promedio en cultivo para *P. tuberosa* y *P. pringlei*.....50
Figura 4. Extracción y purificación de giberelinas en bulbos de P*olianthes.* Adaptado de rebers (1994), trucker y roberts (2000). 56
Figura 5. Brotación a la primera semana de siembra de los diferentes tratamientos en *p. Tuberosa.* A, B, C, D: bulbos almacenados en frío (4 ºC. 7, 6, 5 y 4 semanas respectivamente). E. Testigo. F, G, H, I: tratamientos de calor (27 ºC. 7, 6, 5, y 4 semanas respectivamente). J. Bulbos tratados con AG_3. Escala 10 cm. 59
Figura 6. Ilustración de las estructuras del meristemo apical de *P. tuberosa*. A. Meristemo vegetativo. B. Formación de primordios florales. T= túnica; c= corpus; l= primordio foliar; p= primordio del perianto; s= sépalo; pb= plato basal. 61
Figura 7. Transición meristemática en *P. tuberosa*. A. Etapa vegetativa a los 0 dds. B. Etapa de iniciación floral y diferenciación floral a los 30 dds. Flecha indica formación de sépalos. Escala 100 μm 62
Figura 8. Desarrollo meristemático en *P. tuberosa* después del almacenamiento térmico (0 dds). A. Testigo. Tratamientos con frío 7, 6, 5, 4 semanas respectivamente (b,c,d,e). Tratamientos con calor 7, 6, 5, 4 semanas respectivamente (f,g,h,i). Escala =100 μm. 64
Figura 9. Desarrollo meristemático en *P. tuberosa* a los 30 dds. A. Testigo. Tratamientos con frío 7,6,5,4 semanas respectivamente (b,c,d,e). Tratamientos con calor 7, 6, 5, 4 semanas respectivamente (f,g,h,i). J. Tratamiento con AG_3. Escala 100 μm. 68

Figura 10. Efecto de los tratamientos térmicos en el tamaño de los meristemos de los bulbos de *P. tuberosa* a los 0 y 30 dds. A. Largo del meristemo. B. Ancho de la base del meristemo. 70
Figura 11. Meristemos apicales en bulbos de *P. pringlei* a los 0 dds. A. Meristemo pretratamiento. B. Meristemo tratado con frío 6 semanas. C. Meristemo tratado con calor 6 semanas. Escala 100 µm. 72
Figura 12. Desarrollo meristemático en *P. pringlei* a los 30 dds. A. Testigo. B. Tratamiento con frío. C. Tratamiento con calor. D. Tratamiento con ag_3. Flecha indica formación de sépalos. Escala 100 *µm*. 75
Figura 13. Desarrollo meristemático en *P. pringlei* a los 60 dds. A. Testigo. B. Tratamiento con frío. C. Tratamiento con calor. D. Tratamiento con ag_3. Flecha indica formación de sépalos. Escala 100 *µm*. 77
Figura 14. Efecto de los tratamientos térmicos en el tamaño de los meristemos de los bulbos de *P. pringlei* a los 0 y 30 dds. A. Largo del meristemo. B. Ancho de la base del meristemo. Barras oscuras 0 dds. Barras grises 30 dds. Barras blancas 60 dds. 78
Figura 15. Meristemo T1 de *P. pringlei* a los 90 dds. 79
Figura 16. Curvas de calibración para 4 tipos de giberelinas: A1, A3, A4 y a7 en HPLC. Condiciones de fase móvil A= agua acidificada con ácido fosfórico ph= 2.84. B= metanol. Gradiente 10% metanol a 70% en 30 min. 88
Figura 17. Contenido endógeno de GA_4 en platos basales de *P. tuberosa* en testigo (T0) y tratamiento con ácido giberélico (T9) a lo largo del crecimiento vegetativo. 89
Figura 18. Contenido endógeno de GA_4 en platos basales de *P. tuberosa* en los tratamientos de frío a lo largo del crecimiento vegetativo. T1= 7 semanas. T2= 6 semanas. T3= 5 semanas. T4= 4 semanas. 90
Figura 19. Contenido endógeno de GA_4 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en los tratamientos de calor a lo largo del crecimiento vegetativo. T5= 7 semanas. T6= 6 semanas. T7= 5 semanas. T8= 4 semanas. 91

Figura 20. Contenido endógeno de GA_7 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en testigo (T0) y tratamiento con ácido giberélico (T9) a lo largo del crecimiento vegetativo. 92
Figura 21. Contenido endógeno de GA_7 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en los tratamientos de frío a lo largo del crecimiento vegetativo. T1= 7 semanas. T2= 6 semanas. T3= 5 semanas. T4= 4 semanas. 93
Figura 22. Contenido endógeno de GA_7 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en los tratamientos de calor a lo largo del crecimiento vegetativo. T5= 7 semanas. T6= 6 semanas. T7= 5 semanas. T8= 4 semanas. 94
Figura 23. Contenido enógeno de GA_4 en plantas *de Polianthes pringlei* a lo largo del crecimiento vegetativo. T0= testigo. TF= tratamiento con frío durante 6 semanas. TC= tratamiento con calor durante 6 semanas. T9= tratamiento con aplicación de 200 ppm AG_3. 95
Figura 24. Contenido endógeno de GA_7 en plantas de *Polianthes pringlei* a lo largo del crecimiento vegetativo. T0= testigo. TF= tratamiento con frío durante 6 semanas. TC= tratamiento con calor durante 6 semanas. T9= tratamiento con aplicación de 200 ppm AG_3. 96

I. RESUMEN

El Experimento se llevó a cabo mediante el almacenamiento térmico en frío y calor previo a la siembra de bulbos comerciales de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) y *Polianthes pringlei*. Previo a la siembra se realizaron cortes histológicos de los meristemos apicales y se identificación giberelinas endógenas con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos en la floración, en el desarrollo meristemático y su participación de las giberelinas endógenas. La experimentación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Asistencia y Diseño del Estado de Jalisco - CIATEJ. Los bulbos se almacenaron en cámaras de refrigeración con temperaturas constantes a 4 ºC durante 4, 5, 6 o 7 semana y a 27 ºC durante 4, 5, 6 o 7 semanas. Para *P. tuberosa* y 6 semanas para *P. pringlei* a las mismas condiciones de temperatura. Los caracteres florales evaluados fueron: largo de tallo, largo de espiga, grosor de tallo, número de flores y días a floración. No existieron diferencias significativas en las variables de largo de tallo, número de flores ($p>0.05$), sin embargo si existieron diferencias en largo de espiga con valores entre 27.49 a 35.29 cm. El tratamiento con aplicación de ácido giberélico a razón de 200 ppm por inmersión previo a la siembra, presentó el mayor grosor de tallo. Los mejores resultados con menores días a floración se presentaron en bulbos que fueron tratados con temperaturas de calor por 6 semanas y frío por 7 semana, presentando una media de floración a los 100.88 y 104.01 dds respectivamente, el grupo de bulbos de nardo tratados con calor presentaron mayor homogeneidad en la curva de cosecha y no se afectaron sus características morfológicas con relación al testigo sin tratamiento térmico y con el control tratado con ácido giberélico (AG_3). Se analizó el desarrollo de los meristemos apicales en el bulbo presentando inducción e iniciación floral en el interior del bulbo de nardo al pasar por el almacenamiento térmico y la organogénesis hasta llegar a los 30 dds. Los cambios de concentración de GA_4 y GA_7 sugieren que las giberelinas participan parcialmente en la etapa de floración del nardo. Con base en estos resultados se sugiere que los tratamientos térmicos tienen un efecto positivo en la floración de *P. tuberosa*.

II. ABSTRACT

It was carried out the experiment heat and cold storage before planting commercial tuberose bulbs (*Polianthes tuberosa* L.) and *Polianthes pringlei*, were made histological sections of apical meristems and identification of endogenous gibberellins in order to evaluate the effect of treatments on the flowering meristem development and participation of endogenous gibberellins in the Centro de Investigacion en Asistencia y Diseño del Estado de Jalisco - CIATEJ. The bulbs were stored at constant temperatures for cold at 4 °C in 4, 5, 6 or 7 week and heat treatment at 27 °C at 4, 5, 6 or 7 weeks for *P. tuberosa* and 6 weeks for *P. pringlei* to the same conditions of temperature. Floral characters evaluated were: stem length, spike length, stem thickness, number of flowers and days to flowering. There were no significant differences in the variables of stem length, number of flowers and there were differences in spike length with values between 27.49 to 35.29 cm. Treatment with application of gibberellic acid at 200 ppm by dipping before planting showed the thicker floral stem. The best results with fewer days to flowering were presented in bulbs that were treated with heat temperatures for six weeks and in the bulbs that were treated with cold for seven weeks presenting an average flowering to 100.88 and 104.01 days after sowing respectively, the group of tuberose bulbs heat treated presented greater uniformity in harvest blooming curve and their morphological characteristics were not affected compared to the control without heat treatment and extra control treated with gibberellic acid (GA_3). The development of apical meristems in the bulb presenting induction and floral initiation into the bulb of tuberose passing through the thermal storage and organogenesis up to 30 days after sowing analyzed. The changes in concentration of GA_4 and GA_7 suggest that gibberellins partially involved in the flowering stage of tuberose. Based on these results it is suggested that thermal treatments have a positive effect on the flowering of *P. tuberosa.*

III. INTRODUCCIÓN

Tuberosa o nardo (*Polianthes tuberosa* L.) es una planta ornamental bulbosa, es producida en regiones tropicales y subtropicales como una flor de corte o planta de jardín (De Hertogh y Le Nard, 1993). Esta especie requiere alta luminosidad sin embargo no es afectada por el fotoperíodo, debido que es una flor de día neutro que generalmente induce floración con altas temperaturas (Barba-González *et al*., 2012).

La especie *P. tuberosa* es adecuada para utilizarla como flor de corte, en México el ciclo natural de floración a campo abierto comienza a finales de verano hasta inicios del otoño. Es una planta que no resiste la época invernal en el suelo, por lo cual las producciones se restringen a condiciones estacionales. Cada bulbo sembrado tiene potencial para producir una flor, sin embargo el porcentaje de floración en invierno disminuye (González *et al*., 1992), por esta razón es conveniente llevarlos a un período de descanso después de la primera producción con el fin de sincronizar la floración y obtener una producción más homogénea y cosechas coordinadas durante todo el año (Shillo, 1992).

El nardo es un cultivo exigente en temperatura, su crecimiento se detiene a de temperaturas inferiores de 8 ºC. La temperatura óptima para el crecimiento es de 20 ºC a 30 ºC durante el día y la temperatura óptima nocturna está entre 15 ºC a 20 ºC (De Hertogh y Le Nard, 1993); si superan estos rangos de temperatura se presentan problemas de pudrición y deformaciones florales. La humedad relativa óptima está entre 60% - 70%. Los suelos para el cultivo deben ser de preferencia de textura arenosa a franco-arenosa con buena cantidad de materia orgánica (4 - 5%) y con un pH de 6.5 – 7.0. La densidad de siembra considerando el follaje abundante puede estar alrededor de 100000 bulbos.ha^{-1}, variando distancias de siembra por países y productores, en México la densidad de plantación es de 55000 bulbos.ha^{-1}, mientras que en Kenia de 200000 plantas.ha^{-1} (Watako y Ngamau, 2013).

Las limitaciones para la producción de nardo es por la falta de control en el forzamiento o programación de producciones de los bulbos y desde hace varios años los cultivadores han realizado investigaciones en el control de factores ambientales o han incursionado el uso fitoreguladores con el fin de obtener floración antes del tiempo natural. Es posible cultivar nardos en cultivo protegido previo a un forzamiento e inducción para obtener producciones en invierno, sin embargo más largo el período de floración en comparación con períodos de verano y primavera, lo que implica que el nardo resista bajas temperaturas en condiciones de cultivo monitoreadas (Watako y Ngamau, 2013).

Por lo comentado anteriormente el presente trabajo pretende comprender el efecto de las temperaturas de almacenamiento sobre la floración de bulbos de la especie *Polianthes tuberosa*, La información generada en la presente investigación puede ser utilizada para efectos de producción comercial y obtener cosechas en épocas de mayor demanda.

IV. ANTECEDENTES

4.1. GENERALIDADES SOBRE LA GEOFITAS

La industria de flores de bulbo produce grandes cantidades de plantas adaptadas a muchas zonas que se comercializan como flor de corte, planta de maceta o plantas ornamentales. Los mayores productores se han establecido en zonas en las que se logra duplicar ciclos mediante prácticas culturales y control de factores ambientales que requiera la especie para la iniciación floral y el desarrollo (Kamenetsky, 2005).

Geofitas o flores de bulbo se refiere a todos las plantas que poseen bulbos verdaderos, cormos, tubérculos, rizomas, raíces tuberosas o cualquier otro órgano de reserva y almacén bajo la tierra. En el mundo existen alrededor de 32.000 hectáreas cultivadas para este tipo de plantas, sin embargo solo 6 géneros componen el 90% de la producción que son son tulipán (39%), narciso (20%), lilium (19%), gladiolo (8,5%), jacinto (4%) e iris (3%) (De Hertogh y Le Nard, 1993).

4.2. El género *Polianthes*

Plantas del género *Polianthes* subgénero *Polianthes* son plantas monocotiledóneas bulbosas nativas de México, *P. tuberosa* es utilizada en la industria de los cosméticos y ornamental y se produce en regiones tropicales y subtropicales en países como India, Nueva Zelanda, Japón y México ((Bahadoran *et al*, 2011; Naidu y Reid, 1989) pertenece a la familia Asparagaceae (Lobna y Rawia, 2011), tiene características adecuadas para utilizarla como flor de corte.

Las especies silvestres del género *Polianthes* se distribuye en México en 18 estados. Algunas de estas presentan potencial ornamental y para el fitomejoramiento (Cuadro 1) tal como lo describen Barba-González *et al.* (2012). Los autores

estudiaron 16 especies nativas como son: *P. howardii* con distribución en Colima y Jalisco; *P. bicolor* y *P. oaxacana* en Oaxaca; *P. montana* y *P. longiflora* distribuidos en Jalisco y Nayarit; *P. graminiflora* en los estados de Aguascalientes, Jalisco y Zacatecas; *P. geminiflora* con una gran distribución desde Durango a Nayarit y en los estados del sur de Puebla y Guerrero; *P. zapopanensis* en Jalisco; *P. multicolor* en Guanajuato; *P. densiflora* al norte del país en Chihuahua; *P. platyphylla* con distribución restringida al sur de Durango, Jalisco, Nayarit y Zacatecas; *P. venustuliflora* en el estado de Michoacán; *P. palustris* únicamente reportado en Nayarit; *P. tuberosa* es una especie cultivada, de la cual no hay registros en estado silvestre; *P. nelsonii* en los estados de Durango, Aguascalientes y Chihuahua; *P. sessiflora* en Aguascalientes, Durango, Jalisco, Nayarit, San Luis Potosí y Zacatecas.

Cuadro 1. Distribución en México de especies silvestres y cultivadas del género *Polianthes* con potencial ornamental.

Especie	**Lugar de distribución**
P. howardii	Colima y Jalisco
P. bicolor y P. oaxacana	Oaxaca
P. montana y *P.longiflora*	Jalisco y Nayarit; Puebla y Guerrero
P. zapopanensis	Jalisco
P. multicolor	Guanajuato
P. densiflora	Chihuahua
P. platyphylla	Durango, Jalisco, Nayarit y Zacatecas
P. venustuliflora	Michoacán
P. palustris	Nayarit
P. tuberosa	Especie cultivada
P. nelsonii	Durango, Aguascalientes y Chihuahua
P. sessiflora	Aguascalientes, Durango, Jalisco, Nayarit, San Luis Potosí y Zacatecas

La época de plantación de plantas de nardo comercial simple y doble juega un papel muy importante en el desarrollo y calidad de la flor ya que el ciclo natural de floración comienza a finales de verano (Hurquhart y Hanks, 2004; Barba-González *et al*., 2012) y hasta inicios de otoño (Armitage y Laushman, 1990; Moftah y Al-Humaid, 2006) y por ser una planta que no resiste la época invernal severa, las producciones se restringen a condiciones estacionales (Tawilla, 2000).

El órgano de reserva de las especies del género *Polianthes* son bulbos subterráneos, que consisten en raíces adventicias y superficiales, con un tallo axial corto carnoso divido en plato basal y en la parte apical del plato contiene un meristemo principal central vegetativo o con un tallo floral formado sin expandir y varios ápices axilares los cuales dan origen a bulbillos desarrollados cuando el bulbo madre envejece. El limbo está conformado por escamas bulbares envolventes, que contienen nutrientes de reserva. Las flores tienen un perianto en forma de embudo que produce una fragancia agradable (Amin *et al.*, 2012).

Las flores son usadas para decoraciones en arreglos florales y guirnaldas artísticas. Además tienen una alta demanda en el mercado, especialmente en los mercados asiáticos y países de África del norte. Su producción es altamente rentable por la densidad de siembra y la producción continua o estacional, con rendimientos entre 9 a 19 $ton.ha^{-1}$ de flores. Kenia ocupa una posición privilegiada en la venta de nardo geográficamente para el mercado europeo de acuerdo a la Autoridad de Desarrollo de Cultivos Hortícolas de Kenia (HCDA, por sus siglas en inglés) (Watako y Ngamau, 2013).

Existen tres tipos florales en las variedades de *P. tuberosa* las cuales son: 1) individuales con una fila de segmento de corola, 2) semidoble con dos o tres filas y 3) las doble que tienen más de tres hileras de segmento de corola (Amin *et al.*, 2012). La producción de flores se logra por la plantación de los bulbos grandes en verano y primavera. La cosecha es en primavera y principios de otoño, cada bulbo

tiene el potencial de producir un solo tallo floral, sin embargo, el porcentaje real de floración es influenciado por el tamaño del bulbo y las condiciones ambientales, esto puede dar una explicación de la desaparición del mercado europeo y una posible opción para investigaciones enfocados a solucionar los problemas de floración estacional (Shillo, 1992).

El nardo es un cultivo exigente en temperatura, su crecimiento se detiene por debajo de temperaturas de 8 ºC, la temperatura óptima para el crecimiento es de 20 a 30 ºC durante el día. La temperatura óptima nocturna está entre 15 a 20 ºC (Muriithi *et al*., 2011); si superan estos rangos de temperatura existen problemas de pudrición y deformaciones florales. La humedad relativa óptima está entre 60 - 70%; los suelos para el cultivo deben ser de preferencia textura arenosa a franco-arenosa con buena cantidad de materia orgánica (4-5%) y con un pH de 6.5 – 7.0. La densidad de siembra considerando el follaje abundante puede estar alrededor de 100000 bulbos.ha^{-1}, variando distancias de siembra por países y productores en México la densidad de siembra es de 55.000 bulbos.ha^{-1}, en Kenia el marco de plantación de 25 x 20 cm entre hileras y plantas, respectivamente (Watako y Ngamau, 2013) lo que resulta 200000 pl.ha^{-1}.

El nardo se siembra en suelos ligeros a profundidad de 8 – 10 cm y calibres de 10/12 que se refieren a diámetros entre 2.5 a 3.5 cm (Asif *et al*., 2001; Poursafarali *et al*., 2011) con el fin que producir flores vigorosas y mejor calidad con relación a sembrar calibres menores de bulbos.

4.3. ORIGEN Y HÁBITO DE CRECIMIENTO

Las plantas bulbosas se encuentran en todo el mundo, sin embargo los hábitats con alto porcentaje de especies se encuentran entre latitudes 23º Norte y 45º Sur. Son plantas con un almacenamiento autónomo y altamente desarrollado para lograr vivir en diferentes condiciones climáticas, estas características tienen ventajas ecológicas

que permiten la sobrevivencia en un modo de reposo en períodos desfavorables como climas muy secos, muy calientes o muy fríos hasta que las condiciones mejoren (Rees, 1992).

Es poco el conocimiento que se tiene sobre el desarrollo de los bulbos, lo que se conoce es que existen señales medioambientales como la temperatura, cantidad de luz que al aparecer interfieren en los procesos activando las vías hormonales regulatorias (Rees, 1992).

Los órganos de reserva de las plantas geofitas adaptadas a ambientes no favorables ocurre bajo tres situaciones: la estructura de la planta se ha reducido para la perennidad y debe ser reemplazado por lo menos parcialmente a partir de reservas de almacenamiento, la segunda situación cuando la temporada de crecimiento es corto y el desarrollo se produce en período de reposo y la última situación es en la cual las reservas para el desarrollo son almacenadas en una temporada y el desarrollo masivo, floración y fructificación en otra temporada (Rees, 1992).

La evolución de las geofitas a varias condiciones climáticas les ha permitido adaptarse a períodos de bajas y altas temperaturas o sequías, cambiando sus ciclos anuales de crecimiento, floración y latencia; la variación entre las especies para llegar a la floración es distinta de acuerdo al grupo que pertenezcan, en las especies de origen tropical y subtropical el crecimiento meristemático continua durante todo el año y en ciertas especies el meristemo apical produce los órganos vegetativos y reproductivos autónomamente, esto significa que los cambios de fase no están sujetos a las condiciones climáticas, las especies tropicales y subtropicales no tienen fotoperíodos específicos o temperaturas para florecer, ejemplos son *Hippeastrum* y *Zephyrantes*. Las geofitas originarias de zonas templadas cesan su crecimiento en días cortos y en bajas temperaturas forman hojas vegetativas (Kamenetsky y Okubo, 2013).

Plantas con órganos de reserva no solo están confinadas a angiospermas ya que existen algunos helechos que poseen rizomas. Los restos fósiles encontrados indican que las geofitas habitaban en los comienzos de la evolución de las plantas. La evolución para los diferentes hábitats está definido a plantas del grupo de las monocotiledóneas, las cuales han perdido el cambium, lo que les beneficia para el desarrollo continuo simpodial[1] en los trópicos; la ausencia de engrosamiento secundario significa que el crecimiento en diámetro se logra a través del primer eje embrionario, un proceso lento en el que muchos entrenudos se encuentran cerca o al nivel del suelo. El sistema de raíces son adventicias ya que se originan en la parte inferior del órgano de reserva; el crecimiento de las yemas de los posibles nuevos brotes basales están limitados por la dominancia apical o por la inhibición por estar en estado de dormancia, los brotes laterales crecen solo cuando la flor principal se ha formado y se encuentra en senescencia, depredada o interrumpida, cada nuevo brote lateral tendrá un brote subterráneo. La necesidad de inhibir el crecimiento en extensión responden a estímulos medioambientales y de hormonas, como formar cubiertas exteriores para evitar la pérdida de agua, reducir la tasa de respiración y conservar los nutrientes dentro de los órganos subterráneos (Rees, 1992).

Las ventajas de las plantas bulbosas o geofitas en la horticultura están relacionados por la forma de propagación y la adecuada distribución, con buena vida de almacenamiento y la resistencia a la deterioración, además de la ventaja importante que al ser reproducción vegetativa, genéticamente son iguales a la planta madre. Lo que genera la posibilidad de manipular la emergencia de la flor fuera de la época natural ya que depende de condiciones naturales, especialmente la temperatura (Rees, 1992).

[1] Tipo de crecimiento donde la yema axilar reemplaza a la yema terminal.

4.3.1. Dinámica del crecimiento de bulbos

La propagación del nardo comercial es únicamente vegetativa ya que sus flores son estériles y no generan semillas viables. Los bulbos o bulbillos nuevos se obtienen a partir del bulbo madre, el cual ya ha sido cosechado. Este bulbo se seca fuera del suelo para posteriormente separar los bulbos laterales. Los bulbos separados ingresan al engorde lo antes posible, el tiempo de engorde puede ser desde algunos meses hasta 3 o 4 años los más pequeños (calibres 2/4) (Hatamzadeh *et al.*, 2012).

Las especies silvestres perennes del género *Polianthes* interrumpen su crecimiento durante el invierno y posterior a ello su reproducción es sexual mediante semillas o de forma vegetativa por formación de bulbos, las semillas pasan en el suelo en latencia por largos períodos de tiempo o hasta que las condiciones medioambientales favorezcan su germinación y crecimiento; en México ocurre en verano (Barba-González *et al*., 2012).

4.4. DORMANCIA Y VERNALIZACIÓN

4.4.1. Dormancia

Una de las limitaciones en la producción de campo es la falta de control de tiempo para la floración; desde hace muchos años los cultivadores de bulbos han realizado investigaciones (Dhua *et al*., 1987; Armitage y Laushman, 1990), como lo mencionó desde inicio del siglo anterior Weathers (1911) con el fin de provocar la floración antes del tiempo natural o retardarla para épocas de demanda. En condiciones naturales los bulbos permanecen en el suelo en estado de dormancia o latencia; para prácticas hortícolas los bulbos se levantan y se almacenan en sitios específicos con el fin de acortar o alargar la floración (Rees, 1966).

Los bulbos luego de florecer comienzan un período de reposo con el amarillamiento de hojas; no existe deshidratación de bulbos como ocurre en la maduración de semillas. Esta dormancia favorece a los bulbos y plantas tuberosas como *Solanum tuberosum* para la preservación y para el transporte por largos períodos de tiempo entre países como es el caso del tulipán, estas bulbosas se han estudiado con mucho detalle debido a su importancia económica. Cuando el eje principal (meristemo apical) está creciendo, las yemas laterales se suprimen por un mecanismo de dominancia que es eficaz hasta cuando el eje principal ha cesado su crecimiento. El ingreso a esta etapa de latencia es por baja temperatura o por mala aireación (Chouard, 1960).

La dormancia es un estado dinámico fisiológico, morfológico y bioquímico con suspensión de un visible crecimiento sin cambios externos aparentes en la estructura que contiene los meristemos (Kamenetsky y Okubo, 2013), se subdivide en endodormancia la cual es controlada por señales internas percibidas, paradormancia que consiste como una respuesta bioquímica por otro órgano de la planta y la ecodormancia como resultado de factores ambientales (Rees, 1992). Por ejemplo, bajas temperaturas en invierno reducen o inhiben el crecimiento foliar en fresas, debido a una ecodormancia, ya que al ser movidas a condiciones favorables reanudaran el crecimiento normal, sin embargo este crecimiento será menos vigoroso que las plantas con frío; lo que nos indica que la dormancia por frío en fresa es parte ecodormancia y también endodormancia (Michalczuk, 2008).

El contenido de agua en los tejidos dentro de las plantas leñosas está muy relacionada con los cambios en el transporte de agua y la ruptura de la dormancia, movilización de nutrientes, activación de enzimas hidrológicas y la intensificación de la respiración. Los cambios en el estado de agua se han relacionado con letargo de las yemas en varias plantas leñosas (Seif-El Yazar, 2013).

4.4.2. Control hormonal de la dormancia

Muchas características bioquímicas y fisiológicas cambian durante el almacenamiento del bulbo, como el contenido de agua, hidratos de carbono, minerales y reguladores de crecimiento (PGRs, por sus singlas en inglés *Plant Growth Regulators*). Estos cambios están vinculados a la respiración y la remoción de hidratos de carbono para promover la suficiente energía para la brotación. Las fluctuaciones en ciertos metabolitos son conocidos para promover la generación de los brotes, sin embargo no existen aún ensayos moleculares para determinar la brotación (Chope *et al*., 2012).

La mayoría de cultivos son producidos fuera del hábitat natural y pueden no estar adaptados a los diferentes climas. Entonces los productores bajo ciertas prácticas agrícolas pueden superar este estado de latencia colocando las plantas en invernaderos, defoliación o tratamiento con productos químicos, en su mayoría con reguladores de crecimiento sintéticos. A pesar de estas prácticas no siempre son exitosos y se puede atribuir a la falta de conocimiento en el control del proceso de la dormancia (Michalczuk, 2008). Durante el invierno en climas templados, existen cambios graduales relativos en niveles de los PGRs, disminuyendo los inhibidores de crecimiento y aumentando las concentraciones de los promotores. En cebolla, auxinas, giberelinas y citocininas aumentaron su concentración, sin embargo aplicaciones exógenas de los mismos no estimularon la brotación en los bulbos (Chope *et al*., 2012).

En general no es fácil decidir que sustancias utilizar para romper la dormancia en las plantas y promover la brotación de hojas y flores. Nitsch (1957), citado por Michalczulk (2008), en su artículo publicado acerca del control hormonal de la dormancia indicó que la participación de factores hormonales en la regulación de la dormancia debe basarse en 3 criterios principales, la cual debe haber un factor transmisible que esté involucrado en la inducción y rompimiento, otro factor es que

los PGRs deben romper la latencia en varios órganos de la planta y como tercer punto clave, debe haber variación en los niveles de concentración en alguna hormona de crecimiento que vaya de forma paralela a la brotación.

Los fitocromos, son receptores de luz y juegan un rol importante en la inducción sobre todo en plantas perennes y anuales en la formación de botones florales y el comienzo en la aparición de brotes; este estímulo es recibido en las hojas y tiene su efecto en los meristemos. A este fenómeno se refiere Nitsch (1957) en la cual concluyó que tiene un impulso transmisible que se sintetiza en las hojas y se expresa en el ápice.

4.4.3. Vernalización

Existen muchas situaciones en la que la vernalización es económicamente importante, en muchas plantas en las cuales las partes vegetativas son las que se comercializan, es una exigencia básica impedir que inicie la floración. En ornamentales, como por ejemplo *Lilium* spp., la vernalización se utiliza comercialmente para obtener floraciones precoces y sincronizadas de modo que las flores se puedan comercializar en determinados momentos del año (Amasino, 2005). Mientras mayor sea el tiempo de vernalización de bulbos de lirio asiáticos, resulta un mayor incremento en anormalidades de flores.

Al plantar los bulbos vernalizados con temperaturas 24 - 26 ºC se reduce el número de flores en las variedades '*Red Carpet*' y '*Sunray*', adicionalmente las altas temperaturas durante el desarrollo floral resultan en pérdidas de flores en lirios asiáticos (Lee y Roh, 2001). La vernalización está definida como la adquisición o aceleración de la habilidad para florecer después de la exposición a bajas temperaturas (Chouard, 1960; Taiz y Zeiger, 2006), sin embargo no hay que confundir el término de vernalización con efectos posteriores a ella; al enfriar papas para aumentar la producción de tubérculos, a veces es mal llamado vernalización,

simplemente utiliza el efecto posterior al frío por vigor vegetativo y no tiene nada que ver con el objetivo específico que es inducir la capacidad de floración (Chouard, 1960).

Sung y Amasino (2004) mencionan que se ha demostrado que el meristemo apical es el que recibe el estímulo. Algunas especies de origen de clima-moderado con exposiciones prolongadas a temperaturas entre 0 – 16 ºC durante 6 - 12 semanas inducen floración sincronizada (Kamenetsky y Okubo, 2013). Bajo estrés hídrico, condiciones desfavorables, las inflorescencias se aceleran (Moftah y Al-Humaid, 2006).

Plantas del género *Lillium* requieren frío para la inducción y la iniciación floral, sin embargo en varias especies de geofitas el frío es necesario para el desarrollo floral y elongación del tallo, más no para la iniciación floral. La vernalización es una adaptación útil para especies que tienen hábitos bienales o invernales, en la que la flor se presenta en primavera, por lo que la palabra hace referencia a este hábito de la palabra en latín *vernus*, que significa "de la primavera"; este tipo de especies también pueden ser promovidas por efecto de largos fotoperíodos (Sung y Amasino, 2004), las diferencias sustanciales entre vernalización y fotoperíodo para promover floración, están en que la primera es una preparación para la iniciación floral y la segunda induce la formación de primordios florales (Chouard, 1960).

La floricultura comercial aprovecha las diferentes situaciones para prevenir o reducir la germinación y desarrollo de las hojas, prevenir la desecación (ecodormancia) como es el caso de la especie *Hippeastrum*, en la cual para almacenar los bulbos o transportarlos se conservan entre 5 a 9 ºC así retardar la emergencia y floración. Para algunas especies, el tratamiento de frío es requerido después de estímulos ambientales o situaciones controladas, en *Iris hollandica* se exponen a temperaturas de 30 ºC antes de enfriar para romper la dormancia (Dole y Wilkins, 2005).

En *Polianthes tuberosa* Kosugi y Kimura (1961) concluyeron que las altas temperaturas son requeridas para la iniciación floral, diferenciación y desarrollo, las mínimas temperaturas de producción están a los 21 ºC, temperatura en la cual la brotación fue lenta pero la floración se aceleró (Armitage y Laushman, 2003; mencionado por Dole y Wilkins, 2005). Después de la floración los bulbos de nardo entran aparentemente en un período de dormancia, esta latencia se puede mantener a bajas temperaturas; la dormancia interna del nardo se rompe a 20 ºC (Dole y Wilkins, 2005).

Existen especies bulbosas en las que la floración es más rápida a altas temperaturas de almacenamiento como por ejemplo en tulipán, jacinto, iris y narciso. Las altas temperaturas favorecen al crecimiento temprano y la iniciación floral. Las razones para un efecto beneficioso con temperaturas altas no son claras. Iris a temperaturas altas promueve la formación de flores, fase de pre-floración. Este requisito de temperatura es normalmente satisfecho por un verano cálido pero no por uno fresco, lo que se refiere esta situación es que el tratamiento a altas temperaturas es esencial después de un verano fresco (Chouard, 1960).

4.5. FORZAMIENTO

El forzamiento consiste en controlar condiciones, regular el crecimiento y desarrollo de las flores de los bulbos; muchas veces este proceso es relativamente fácil, sin embargo aún no se han entendido los principios fisiológicos en su totalidad (De Hertogh, 1996). Se realiza esta práctica ya que existe la necesidad de aumentar la eficiencia y reducir costos de insumos por tallo o flor producida, manteniendo la calidad. Los principios científicos para el forzamiento de las geofitas fueron establecidos por el profesor A. Blaauw y sus colegas de los años 1920’s a los años 1960’s, no solo para el control de la floración sino también para el ciclo de desarrollo de muchas especies (Kamenetsky y Okubo, 2013).

La temperatura es el principal factor que afecta a la florogénesis (fase productiva), en los bulbos de invierno al recibir tratamiento con frío las plantas no inician necesariamente la floración sin embargo adquieren la competencia para hacerlo (Sung y Amasino, 2004). El proceso por el cual una planta en estado juvenil favorece la floración bajo un período prolongado de bajas temperaturas se conoce en muy pocas especies vegetales (Sheldon *et al*., 2000).

Algunas especies de geofitas no requieren exposición al frío para la iniciación floral, por el contrario temperaturas calientes son esenciales para el proceso. Temperaturas de almacenamiento influencian la brotación de bulbos, la calidad y productividad del tallo floral. Las temperaturas óptimas para especies definidas y han sido estudiadas suficientemente, valores de almacenamiento y tiempo se los puede encontrar en libro publicado por De Hertogh (1996) "*Holland Bulb Forcer's Guide*" (Guía para forzamiento de bulbos holandeses; por sus siglas en inglés); para *Lilium* y *Hyacinthus* la iniciación floral se alcanza con temperaturas óptimas entre 20 – 25 ºC y en *Allium* de 9 – 13 ºC, los tratamientos por temperatura interactúan con el tamaño de bulbo, a mayor tamaño generalmente aumenta el porcentaje de floración (Rees, 1992).

Tuberosa o nardo no puede sobrevivir en el ambiente con temperaturas menores a los 5 ºC y no necesita bajas temperaturas en ninguna fase del ciclo de crecimiento (Huang *et al*., 1995). Sin embargo, existen conflictos para nardo, en dos años diferentes el investigador Post (1952) (mencionado por De Hertogh y Le Nard, 1993) señaló que las temperaturas para el mejor crecimiento está a los 21 ºC y Post (1959) (mencionado por De Hertogh y Le Nard, 1993) advierte almacenar a 4.5 ºC; dependiendo de las condiciones de crecimiento posteriores. Rockwell y Grayson (1953) (mencionado por De Hertogh y Le Nard, 1993) sugieren de 18 – 21 ºC durante el ciclo de vida para la floración del nardo. En estudios realizados en la India por Mukhopadhyay y Sadhu, 1987 proponen almacenar a temperaturas de

30 ºC durante 8 semanas, con la restricción de calidad para el tallo floral (De Hertogh y Le Nard, 1993).

Almacenar a 10 ºC por 30 días aumenta la productividad sin embargo almacenar a esa temperatura por períodos mayores de tiempo disminuyen la misma (De Hertogh y Le Nard, 1993). Es importante anotar que estos tratamientos solo pueden realizarse cuando el desarrollo apical ha alcanzado una cierta etapa morfológica, de lo contrario puede haber abortos florales, daños o falta de desarrollo de algunos botones (Rees, 1992).

4.6. GIBERELINAS

Las fitohormonas regulan las respuestas a las plantas frente a estrés abiótico y biótico por medio de acciones sinérgicas o antagónicas entre ellas se encuentras auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas, jasmonatos y brasinosteroides las cuales pueden disminuir o aumentar su concentración dependiendo de la especie (Schmelz *et al.*, 2003). Estas sustancias orgánicas cambian su concentración en los bulbos al realizarse la florogénesis las cuales modulan varios procesos de crecimiento y desarrollo, diferenciación celular, senescencia, etc. (Lobna y Rawia, 2011).

En Japón en el año de 1935 fitopatólogos descubrieron el hongo *Gibberella fujikuroi* que causa crecimiento excesivo en plantas de arroz, posteriormente en 1950 se logró aislar a partir de las secreciones del hongo, identificando el compuesto como giberelina. Desde aquel año hasta la actualidad se han realizado el aislamiento de giberelinas en tejidos vegetales; las numeraciones de las giberelinas descubiertas se asignaron de acuerdo al orden cronológico de descubrimiento y hasta la actualidad se conoce cerca de 136 tipos de esta hormona (Serrani, 2008).

Aplicaciones de giberelinas regulan varios procesos de brotación, elongación del tallo, número de hojas, contenido de clorofila (Rani y Singh, 2013) rompimiento de la dormancia y germinación (Rebers, 1994) por estas razones a las giberelinas las han considerado como la hormona universal de floración, el proceso de la transición floral aún se encuentra en investigación (Kamenestsky y Okubo, 2013) en general se reportan como sustituyente de día largo y reemplazadoras de frío (Chang *et al.*, 2001).

Las giberelinas endógenas presentes en las plantas provienen de la síntesis a partir del isopreno, denominada vía de terpenoides, de esta ruta también se síntetizan otras hormonas y de kaureno. Las giberelinas (GAs) están divididas en dos grupos, las de C20-GAs con 20 carbonos en su estructura (GA_{12}) y las de C19-GAs con 19 carbonos (GA_9). En cada grupo existen variaciones en el grado y posición de la oxidación, generalmente hidroxilación (Rebers, 1994). La presencia o ausencia de los grupos hidroxilo y la estequiometria en las posiciones C-2, C-3, y C-13 del *ent*-giberelina de las GAs C-19 determina la bioactividad de las giberelinas, dentro de las plantas son muy escasas, las giberelinas conjugadas son precursoras, productos de inactivación, productos de desecho o se encuentran en forma conjugada para ser transportadas por distancias largas dentro de la planta (Graebe, 1987; Rebers, 1994).

4.6.1. Estructura y biosíntesis

El metabolismo de giberelinas ha sido muy estudiado y se han identificado un buen número de genes, a través de la purificación convencional de la enzima, mediante cribado funcional de expresión de cadenas de ADN o molecularmente, utilizando mutantes defectuosos en síntesis de giberelinas; sin embargo aún sigue incompleta la biblioteca de genes que codifican enzimas, las vías metabólicas son complicadas y se desconoce la función de muchos mecanismos de reacciones enzimáticas. Las giberelinas son activadas o inactivadas durante el ciclo de la planta principalmente

sintetizadas en frutos en desarrollo o semillas, regiones de crecimiento apical, raíces y hojas jóvenes (Graebe, 1987).

Las giberelinas mayormente activas incluyen a la GA_3, GA_4 que en común tienen un grupo hidroxilo en C-3β, grupo carboxilo en C-6 y una lactona C-4 y C-10; el grupo carboxilo C-3β puede ser reemplazado por otras funcionalidades como C-2 y C-3 para actuar bioactivamente (GA_5, GA_6). GA_1 se ha identificado con frecuencia en gran variabilidad de especies de plantas, lo que aduce que participa activamente en los procesos así como también GA_4 (Yamaguchi, 2008).

La biosíntesis de las giberelinas están divididas en 3 etapas: a) la biosíntesis de *ent*-kaurene, b) la biosíntesis de la GA_{12}-aldehido y c) la biosíntesis después del GA_{12}-aldehido (Graebe, 1987). La biosíntesis proviene desde el geranilgeranil difosfato (GGDP), precursor común C20 para diterpenoides, tres clases de enzimas se requieren para la biosíntesis: terpeno sintasas (TPSs), citocromo P450 monoxigenasas (P450s) y 2-oxoglutarato-dependiente dioxigenasas (2ODDs); dos TPSs, *ent*-copalyl difosfato sintasa (CPS) y *ent*-kaurene sintasa (KS) que se encuentran en los plastidios son responsables en la conversión de GGDP al hidrocarburo intermedio tetracíclico lipofílico (Graebe, 1987) *ent*-kaurene, a continuación se convierte en GA_{12}-aldehido por dos moléculas de P450 por acción de *ent*-kaurene oxidasa (KO) y requiere NADPH como único cofactor (Graebe, 1987) que cataliza la oxidación secuencial en C-19 para producir ácido kaurenoico. GA_{12} se convierte en GA_4 (forma bioactiva) a través de oxidaciones en C-20 y C-3 por acción de GA_{20} oxidasa (GA20ox) y GA_3 oxidasa (GA3ox), en el año de 1978 se descubrió que la conversión de GA_{12}-aldehido a las formas activas se catalizan enzimáticamente por acción de hierro (Fe^{+2}) y se inhiben por el elemento manganeso (Graebe, 1987).

La introducción de un grupo 3β hidroxilo convierte precursores inactivos (GA_9 y GA_{20}) en sustancias bioactivas. Algunas enzimas como la GA3ox poseen la

capacidad para sintetizar GA_3 y GA_6 desde GA_{20} a través de GA_5. GA_{12} también es un sustrato para GA_{13}ox para la producción de GA_{53} que es un precursor de GA_1 en la vía 13-hidroxilado (Yamaguchi, 2008). Para generar GA_1, la conversión comienza por GA_{53} a GA_4, GA_{19} a GA_{20}, mediado por GA_{20}-oxidasa y posterior a ello de GA_{20} a GA_1 por GA3-hidroxilasa, La síntesis de GA_1 funciona como un sistema de retroalimentación que ocurriría cuando la GA_1 es reconocida por su aceptor (en el citosol) y constituiría una señal que provoca la síntesis de la GA_{20}-oxidasa y GA3-β-hidroxilasa (Jordan y Casaretto, 2006).

Las giberelinas en forma conjugadas son asociaciones covalentes de GAs con compuestos de bajo peso molecular, generalmente glucosa en forma de piranosa, estas pueden estar vinculadas a una fracción del grupo hidroxilo (giberelina glucosil éter) o al carboxilo C-7, generalmente las giberelinas conjugadas son inactivas pero al hidrolizarse se libera la fracción de giberelina (GA), que puede o no estar bioactiva de acuerdo a la estructura; las GAs-conjugadas que se encuentran generalmente en semillas podrían ser las formas de almacenamiento en las plantas de giberelinas (Graebe, 1987).

Estudios realizados han indicado que la señalización de GAs están involucradas en el mantenimiento de sacarosa en el floema fuente-sumidero, en el transporte de larga distancia de la sacarosa por las células del floema a través del sistema vascular y el metabolismo de la misma (sacarosa) (Rani y Singh, 2013).

Algunos experimentos muestran que las giberelinas juegan un papel importante en el control de la dormancia, en órganos de la planta como hojas, yemas, bulbos y semillas el contenido es bajo pero aumenta antes del rompimiento de la latencia (Michalczulk, 2008).

4.6.2. Inhibidores de giberelinas

Los métodos para conocer la respuesta fisiológica de las giberelinas son utilizando bloqueadores químicos y mutantes genéticos en las que los genes inhiben la biosíntesis o reducen la sensibilidad a giberelinas. En el caso de *Polianthes tuberosa* se desconoce si existen mutantes.

Los retardadores de crecimiento en las plantas actúan en la inhibición de la biosíntesis de giberelinas endógenas, bajas concentraciones en contenidos de GAs y cambios morfológicos. Los inhibidores utilizados son compuestos de amonio cuaternario, los cuales tienen efectos en impedir la biosíntesis de la *ent*-kaureno sintetasa, compuestos por cloruro 2-cloroetil trimetilamonio, estos dos compuestos tanto los de amonio cuaternario y CCC además de inhibir la biosíntesis de la enzima de *ent*-kaureno, inhiben la biosíntesis del esterol (Graebe, 1987).

Compuestos derivados de pirimidinas, como el ancimidol, norbonornenodiazetina; compuestos de triazol, como el paclobutrazol, triapentenol, uniconazole, actúan alterando el metabolismo del esterol. Los compuestos mencionados tienen amplio espectro de acción son transportados a través del xilema y por esta razón son más activos cuando se aplican a través de las raíces o tallos con relación a la pulverización sobre las hojas. Todos los compuestos inhiben a partes de la planta en los 3 primeros pasos de la oxidación de *ent*-kaureno (*ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal y ácido *ent*-kaurenoico), sin embargo las vías de síntesis siguientes no se ven afectadas (Graebe, 1987).

4.6.3. Plantas bulbosas y la relación con giberelinas

Algunas investigaciones han comprobado que las giberelinas están estrechamente involucradas en el proceso de floración realizando aplicaciones exógenas en los bulbos, como por ejemplo ensayos en iris demostraron que aplicaciones de ácido giberélico en 3 concentraciones 250, 500 y 750 ppm florecieron más temprano que los controles, el mismo efecto se encontró en dalias, y gladiolos (Taha, 2012); también se sugiere que las giberelinas son reemplazadoras de frío o de la vernalización, en investigaciones realizadas por Naor *et al.* (2008) con aplicaciones de ácido giberélico encontraron que los niveles de giberelinas sufren aumentos temporales a los 15 d antes de la aparición de las inflorescencias en *Zantedeschia;* sin embargo Rebers *et al.* (1996) encontraron que los niveles de giberelinas en bulbos aunque sufren cambios de niveles no son sustituidos en el tulipán tratados con frío, ya que los niveles no fueron significativos.

El papel de las giberelinas en la transición floral es difícil de establecer. Existen muchos ejemplos en los que cambios en cantidad o composición de GAs endógenas conducen a una inducción floral y también aplicaciones en algunas especies de forma exógena pueden favorecer a la inducción floral, en plantas de día corto son poco eficaces en la inducción floral, adicionalmente en plantas leñosas las GAs inhiben la floración aunque si la promueven en las coníferas. Inclusive dentro del mismo grupo de plantas de día largo un mismo tipo de giberelina tiene efectos diferentes. La relación de giberelinas y la vernalización ha recibido mucha atención debido a que en algunas especies puede sustituir los requisitos de frío como en los cereales (Levy y Dean, 1998).

Las plantas de *Lolium temulentum* permanecen en etapa vegetativa cuando se cultiva en días cortos, al exponerlos en condiciones de día largo aparecieron las flores, bajo condiciones de día corto y aplicaciones de giberelinas las plantas

también florecieron, adicionalmente se encontraron aumentos de giberelinas en hojas, tallos y peciolos, bajo condiciones de día largo (King *et al*., 2001).

Existen también estudios realizados en citoquininas y su efecto en el desarrollo floral, Cang (2000) realizó un estudio en la cual los bulbos de nardo tuvieron mayor concentración en los estadios jóvenes de floración y desarrollo en comparación con los estadios vegetativos, especialmente la zeatina y la dihidrozeatina. En la misma investigación se muestran los cambios de los tipos de giberelinas, un incremento en los niveles de GA_{20} y disminución de GA_{19} en relación desde la fase vegetativa hasta la diferenciación de la flor; mientras que GA_{53} se mantuvo constante sin presentar cambios. Adicionalmente al aplicar exógenamente, las inducciones se promovieron mayormente con GA_3, GA_{20} y $GA3_2$, lo que sugieren que están relacionadas en la inducción floral del nardo.

Chang *et al.* (2001), realizaron una investigación sobre giberelinas y su relación con la floración en *P. tuberosa* probando algunas giberelinas (GA_1, GA_{19}, GA_{20} y GA_{53}), en la cual GA_1 no se detectó en estado vegetativo, incrementó su nivel durante la fase de iniciación floral, concluyendo así que GA_1 es el factor causal para la iniciación floral. Estos cambios en concentración de fitohormonas pueden ser utilizados como marcadores fisiológicos para indicar la transición de desarrollo hasta floración ya que las giberelinas están correlacionadas con la síntesis de almidón en los órganos de reserva (bulbos) y alargamiento de brotes por aumento de la enzima α-amilasa, sin embargo aún se tiene estudios limitados entre los cambios hormonales de los tejidos y la dormancia de las yemas (Naor *et al*., 2008).

En un ensayo realizado en India, evaluaron el pretratamiento de bulbos de nardo con ácido giberélico (GA_3), en el cual no tuvo efecto en el rompimiento de la dormancia y la brotación (Nagar, 1995); lo que si se encontró en el artículo citado son altos niveles de ácido abscísico libre (ABA) durante el período de reposo y fue reduciéndose con la liberación de la dormancia. Lo que sugiere que algunos autores

citados tuvieron diferencias y otros al parecer no y que los mecanismos de control de dormancia en nardo aún no se han dilucidado.

Estudios en tuberosa se han realizado en diferentes países, climas y calibre de bulbos, con aplicaciones exógenas de reguladores de crecimiento, identificando variables de repuesta de crecimiento, desarrollo y floración (Cuadro 2). Cang (2000), notificó la existencia de mayor concentración de GA_3, GA_{20}, GA_2 en desarrollo y etapas jóvenes de floración con relación a estadíos vegetativos y así también, Chang *et al.* (2001), analizaron el comportamiento de GA_1, GA_{19}, GA_{20} y GA_{53}, llegando a concluir que participan en los procesos de floración, sobre todo GA_1 y las demás giberelinas en procesos de crecimiento y elongación vegetativa. Las giberelinas endógenas incrementan su concentración cuando se encuentran a bajas temperaturas y están directamente relacionadas con una rápida elongación y crecimiento del tallo, como en la mayoría de geofitas; también se presenta mayor longitud de tallo, espiga floral y número de flores (Huang *et* al., 1995).

Cuadro 2. Algunos experimentos realizados de los efectos de giberelinas con diferentes métodos en *P. tuberosa*.

TITULO DE INVESTIGACION	AÑO	PAIS	TRATAMIENTOS		VARIABLES DE RESPUESTA	
			Temperatura (°C)	Tiempo (días)		
Effect of bulb size, temperature treatment of bulbs and chemical on growth and flower production in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Dhua *et al*., 1987.	1987	India	4; 10 y 30	10; 20; 30	Días a floración	
					Altura de planta	*
					Días para emergencia de hojas	*
					Tallos por bulbo	
					Longitud tallo	
					Productividad (t/ha)	
Physiological studies in tuberose plant (*Polianthes tuberosa* L.). Tawilla, A. S. I. 2000	2000	Egipto	7 y 26	7; 60; 120	Altura de planta	ns
					Número de hojas/espiga	ns
					Peso fresco de la planta	ns
					Peso fresco de las hojas/espiga	ns
Effect of subsequent storage of tuberose (*Polianthes tuberos*a L.) bulbs after low temperature pre-treatment improves growth, percent sprouting and cut flower quality. Watako, A.O. y Ngamau, K. 2013	2013	Kenia	Pretratamiento (120 días)= 5 y 10 (20 °C)	0; 14; 28; 42	Brotación	*
					Días a floración	*
					Longitud tallo	*
					Número de tallos/bulbo	ns
					Grosor de tallo	ns
					Número de flores	*

ns= estadísticamente iguales

4.6.4. Análisis de giberelinas

Las giberelinas carecen de propiedades físicas para la detección físico-química selectiva y antes del desarrollo de cromatografía de gases, estos resultados producían datos semicuantitativos y poca información. Los bioensayos todavía se utilizan para conocer su ausencia o presencia en extractos de plantas, sin embargo las plantas pueden tener inhibidores de giberelinas que pueden interferir en los ensayos.

La cromatografía liquida de alta resolución (HPLC) es un método altamente versátil que permite analizar cuantitativamente las giberelinas endógenas, sin embargo este

método tiene desventajas asociadas a necesidad de disolventes orgánicos peligrosos y procedimientos de extracción y purificación que utilizan gran cantidad de tiempo. Otro método de análisis son las de inmunoensayo de giberelinas, sin embargo son más difíciles de medir con relación a las otras hormonas vegetales, debido a que hay diferencias en las estructuras de cada giberelina. ELISA es una técnica sensible muy confiable para la detección de giberelinas, con el problema de la reactividad cruzada de los anticuerpos y por eso tiene aplicaciones limitadas (Rebers, 1994).

4.6.5. Papel de las giberelinas en la floración de las geofitas

Las fitohormas juegan un papel predominante para la floración, como se mencionó anteriormente, la inducción por giberelinas es una de las 4 vías para promoverla, hay muchos estudios en las cuales la composición en concentración de giberelinas endógenas o la aplicación de determinados tipos de giberelinas pueden favorecer en algunas especies la iniciación floral; Paris y King (1985) mencionado en un artículo publicado por Levy y Dean (1998) indicaron que las giberelinas son eficaces en la floración para plantas de día corto y en general inhiben la floración de la angiospermas leñosas aunque si promueven la floración de coníferas; adicionalmente hacen mención un mismo tipo de giberelinas en plantas de día pueden tener un efecto diferente en cada especie, como por ejemplo para *Lillium* la aplicación de GA_4 potencializa la floración de la planta, sin embargo en *Sinapsis alba* no presenta ningún efecto.

Se puede indicar que en base a los estudios recientes en controles moleculares de la transición floral se están identificando los promotores o supresores de la floración mediante el análisis de mutantes, lo cual beneficiará a la completa compresión del fenómeno más primordial en la fisiología de las plantas con beneficios para el ser humano, como por ejemplo la programación de floración de una especie de interés comercial para épocas de mayor demanda optimizando recursos o evitar excedentes de flores y distribuir los ingresos durante todo el año. En diferentes especies se ha

reportado que auxinas y giberelinas juegan un rol primordial en la respuesta de elongación mediada por el control de temperatura. Por otra parte, las concentraciones de auxinas pueden regular los genes que codifican enzimas para la biosíntesis de las GAs. La acción conjunta de estas dos hormonas garantiza el crecimiento de los brotes y las hojas. (Khodorova y Boitel-Conti, 2013).

4.7. FLORACIÓN

El proceso de floración es la fase final y vital para la industria de la floricultura, el proceso implica una variedad de mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que regulan el momento adecuado y correcto para el desarrollo de los órganos reproductivos (Kamenetsky y Okubo, 2013). Los factores ambientales más importantes que estimulan el inicio y desarrollo floral son el fotoperíodo, intensidad de la luz y la temperatura. La transición entre el estado vegetativo a la etapa reproductiva es el cambio más dramático en el desarrollo de la planta para la agricultura, horticultura y fitomejoramiento ya que implica cambios de señales en la metilación del ADN, dando una señal de inducción al meristemo floral. De los diferentes procesos de desarrollo, la floración es de interés excepcional ya que dentro de la horticultura se estimula o se inhibe esta condición de acuerdo al interés productivo o comercial. La mayoría de estudios sobre floración están basados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ya que posee eventos clásicos y es sensible al fotoperíodo.

Existen cuatro vías de floración descubiertas a través de trabajos realizados en *Arabidopsis* incluyendo la inducción floral por el fotoperíodo, inducción autónoma (no depende del fotoperíodo), regulación por giberelinas y la inducción por hidratos de carbono; además de los factores endógenos como el estado de desarrollo y la edad; los estudios de transición floral han identificado diferentes señales como el aumento de concentración de sacarosa, reducción de compuestos volátiles, giberelinas y citoquininas que se translocan en la savia del floema de las hojas a los

meristemos apicales. La sacarosa puede funcionar como molécula de señalización de larga distancia, en estudios realizados de *Sinapsis alba* (mostaza de día largo) demuestran que al alcanzar la inducción de la floración, la concentración de sacarosa aumenta rápidamente y de forma transitoria, este impulso precede el aumento de división celular que se observa en el meristemo apical; la sacarosa en el meristemo parece derivarse desde los hidratos de carbono en las hojas y los tallos (Levy y Dean, 1998).

La acumulación de glucosa en las plantas se ha demostrado que puede suprimir la expresión de los genes fotosintéticos e inducir la senescencia foliar a través de la vía de la hexoquinasa. La represión de la fotosíntesis se produce al existir acumulación de almidón, a pesar de que el almidón no es metabólicamente activo, la hexoquinasa es un sensor para la represión de azúcar de la fotosíntesis (Samuoliene y Duchovskis, 2012).

Las plantas geofitas tienen diferente ciclo de crecimiento y está determinado por el clima, lluvias y el fotoperíodo que son los factores más importantes (Rees, 1966; Reeves y Coupland, 2000; Kamenetsky y Okubo, 2013) es por esta razón que se deben conocer las técnicas para simular condiciones naturales; en *P. tuberosa* requiere alta luminosidad, no es afectada por el fotoperíodo, debido que es una flor de día neutro y generalmente se induce su floración con altas temperaturas (Barba-González *et al*., 2012).

Antes de ingresar al período de maduración las plantas se encuentran en el período juvenil, en la cual no poseen la capacidad de florecer y su energía se dedica al desarrollo de otros órganos y estructuras; generalmente este período juvenil es relativamente corto en tiempo y definido por características específicas. El número mínimo de hojas o nudos, es muchas veces útil para indicar la terminación del período juvenil en plantas no geofitas.

El período juvenil para plantas geofitas está determinado normalmente por el perímetro del órgano de almacenamiento y tiempo; el género *Triteleia* es de aproximadamente 1 año y de 3-4 cm de perímetro, en cormos 4 a 7 años y de 6 a 10 cm. Las geofitas para inducir floración necesitan suficiente cantidad de follaje (capacidad fotosintética) para soportar el tamaño y la calidad de las flores requeridas para la producción comercial (Dole y Wikins, 2005). En plantas bulbosas la emergencia de brotes o raíces bajo condiciones desfavorables aparentemente se encuentran dormidas, sin embargo al examinar meristemos apicales. éstos pudiesen tener actividad y procesos de iniciación, estas características muestran las estrategias de desarrollo aun ante condiciones adversas (Rees, 1992).

En el proceso de floración intervienen cinco fases que son la inducción, la iniciación, organogénesis, maduración y la antesis. Las diferentes etapas del proceso de floración son controladas por ciertos factores y estos, pueden promover o retardar la floración, previenen o provocan el aborto (De Hertogh y Le Nard, 1993). Cada fase es controlada por múltiples genes que controlan el tiempo de la floración, pudiendo ser para promoverla y otros para reprimirla; algunos genes interactúan con factores ambientales y otros genes parecen actuar de manera autónoma, algunos genes actúan en forma secuencial, los que cambian el rumbo del meristemo (vegetativo – reproductivo) y otros que dirigen la formación de los órganos de la flor (Levy y Dean, 1998).

4.7.1. Inducción floral

La inducción de la floración es un proceso complejo regulado por diversos genes, promotores o inhibidores de crecimiento, activados por diversas señales como la temperatura y el fotoperíodo. En la mayoría de geofitas el factor más importante para promover la floración es la termoperiodicidad (cambios de temperatura y duración del día), mientras que los efectos de la luz son comúnmente menos importantes. Las necesidades fisiológicas para comenzar la floración son

determinadas por el origen ecológico de la especie. Las bulbosas procedentes de zonas templadas como por ejemplo *Allium* e iris, requieren una temperatura alta para la inducción floral seguida por una temperatura baja para la diferenciación meristemática. Especies con origen en la región Irano-Turiano como por ejemplo narciso y tulipán, necesitan temperaturas altas para la inducción, iniciación y diferenciación floral (Khodorova y Boitel-Conti, 2013). Todas estas especies en condiciones de baja temperatura en la época de verano suprimen la inducción floral. Al completarse la diferenciación floral la mayoría de especies requieren temperaturas bajas entre 4 a 9 ºC las cuales permiten la elongación del tallo y la antesis.

La inducción floral es el primer proceso de desarrollo floral y ocurre únicamente en plantas competentes, las células se denominan competentes si pueden responder de una manera positiva a la floración. Durante los períodos juveniles las plantas son insensibles a estímulos de factores de inducción floral y no son capaces de formar órganos reproductivos. La competencia para aceptar la etapa de floración está definida por cambios morfológicos y fisiológicos en las estructuras, en la cual en el meristemo apical se presentan la formación de órganos vegetativos, las hojas, hasta llegar a la fase reproductiva (Samuoliene y Duchovskis, 2012).

La célula o grupo de células pueden promover la floración basados en niveles exógenos (ambientales) y factores endógenos (señales), en toda planta, con excepciones, el meristemo vegetativo se caracteriza por la inactividad junto con su zona central relativamente, denominada fase juvenil del meristemo y es controlada por dos genes SN y DNE, los genes se expresan en hojas y su actividad se reduce mientras más vieja sea la planta. En cambio el gen LFY actúa en el ápice e influye para la competencia equilibrando los promotores e inhibidores florales (Parimalan, *et al*., 2004).

4.7.2. Iniciación floral

Es la segunda etapa en el proceso de floración, ocurre sólo en las plantas donde se producen meristemos de inflorescencia. En las plantas donde no hay inflorescencia como en girasol, forman directamente el meristemo floral y la determinación de los órganos florales. Este tipo de inflorescencia es la única en la que los meristemos se desarrollan para meristemo mediante el ciclo de inflorescencia.

Durante la iniciación de la floración se ponen en manifiesto los primeros signos microscópicos reales de la formación floral en la que el meristemo apical comienza a cambiar de forma (Dole y Wilkins, 2005). A medida que las células se dividen, la inflorescencia se dirige hacia el extremo terminal para completar el ciclo de inflorescencia, una vez que la actividad de genes que suprimen la inflorescencia se activa. El gen más importante implicado en la especificación de la identidad del meristemo floral es LFY descubierto en *Arabidopsis thaliana*, es responsable de la conversión de la inflorescencia que activa a los meristemos florales (Parimalan *et al*., 2004).

4.7.3. Organogénesis o diferenciación floral

Es la etapa donde el desarrollo de la flor es muy importante ya que una vez que la planta alcanza esta etapa, debe completar el proceso de floración. El destino de la diferenciación de las células en el meristemo floral se decide en esta etapa y las espirales se forman sobre el meristemo. Se puede observar ya una flor en miniatura y está determinada como flor pero aun no diferenciada en sus partes. Hasta la etapa anterior (iniciación floral), tienen disposición para revertir del meristemo floral a meristemo vegetativo; ya que las células no tienen diferenciación ni decisión clara de formar la flor.

Según el modelo ABC, la región A da origen a los sépalos (API, AP2); A con B genera los pétalos (AP2 y PI, AP3); B con C a los estambres (P1I, AP3 y AG); y C exclusivamente al carpelo (AG). Otro aspecto importante en este órgano es que la regulación perfecta de las actividades génicas de A, B, y C (modelo ABC) sin interrumpir las otras regiones que fue mantenida por un gen llamado SUPERMAN (SUP). Este gen previene que la región B interfiera con la C. Recientemente se ha identificado un gen "*Rabbit ears*" (RBE) que codifican para la expresión del gen SUP, que a su vez regula los pétalos. Pero en el caso de las flores masculinas este gen suprime el verticilo que desarrolla el carpelo (Parimalan *et al*., 2004).

4.7.4. Antesis

Es la cuarta etapa del desarrollo floral las células quedan diferenciadas y luego forman el órgano reproductor completo (Parimalan *et al*., 2004).

4.7.5. El meristemo apical y su relación en la floración

El crecimiento vegetal y morfogénico está controlado por los meristemos; el meristemo apical sufre modificaciones entre las fases vegetativa a floración (Okamuro *et al*., 1996). La floración es posible si el meristemo es competente para percibir las señales inductoras, adicionalmente también depende del tamaño, comúnmente en las plantas que poseen órganos de almacenamiento se identifica el número de hojas como un indicador de cambio de fase en la floricultura comercial (Kamenetsky y Okubo, 2013).

Las familias de plantas que forman órganos de reserva, translocan los asimilados producidos hacia estos órganos, la distribución entre las hojas y los órganos de almacenamiento son un indicador para la iniciación floral (Samuoliene y Duchovskis, 2012).

En *P. tuberosa* el ápice vegetativo tiene diámetro basal aproximado de 150 μm y largo entre 80-100 μm; en la fase de transición el tamaño está comprendido entre 300-400 μm de diámetro y en la fase de iniciación alcanza tamaños de 600-800 μm de diámetro en la base del meristemo apical. En esta etapa la inducción floral ocurre de 20-25 dds hasta formar la flor completa y la iniciación floral ocurre 90 dds (Curir *et al.*, 1984. Citado por De Hertogh y LeNard, 1993).

V. HIPÓTESIS:

- Los tratamientos térmicos de calor favorecen la floración en el género *Polianthes.*

VI. OBJETIVOS:

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto en la floración por los tratamientos térmicos en una especie silvestre y una variedad comercial del género *Polianthes*.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto a tiempo de floración de los tratamientos térmicos en una variedad comercial del género *Polianthes*.

- Describir los cambios bioquímicos de niveles de giberelinas en bulbos de *Polianthes* sp. al pasar a fase de floración.

- Comparar los cambios bioquímicos y morfológicos entre una especie silvestre y una variedad comercial del género *Polianthes*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS:

7.1. Experimento de temperaturas de almacenamiento en *P. tuberosa*

En la primavera de 2014 (2 de mayo de 2014), bulbos de nardo (*Polianthes tuberosa*) var. Doble calibre 10/12, provenientes de la comunidad Cuauchichinola, en Mazatepec, Morelos, fueron divididos en cuatro grupos. El primer grupo fue almacenado a 4 ºC (±1.83) y humedad relativa promedio de 71% (±8,63), el segundo grupo fue almacenado a 27 ºC (±1.95) con humedad relativa de 53% (±14.84), durante 4, 5, 6 y 7 semanas, el tercer grupo correspondió al testigo absoluto en el cual los bulbos no recibieron ningún tratamiento térmico ni aplicaciones de fitoreguladores y el cuarto grupo fueron bulbos tratados con 200 partes por millón (ppm) de AG_3 previo a la siembra. A partir de estas temperaturas y semanas se dividieron en los diferentes tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos aplicados a bulbos de *Polianthes tuberosa*.

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Tiempo (semanas)	Número de bulbos	Cortes histológicos	Análisis bioquímico	Bulbos plantados
0	n/a	0	24	6	8	11
1	4	7	30	5	8	17
2	4	6	30	5	8	17
3	4	5	30	5	8	17
4	4	4	30	5	8	17
5	27	7	30	5	8	17
6	27	6	30	5	8	17
7	27	5	30	5	8	17
8	27	4	30	5	8	17
9	n/a	0	24	5	8	12

n/a = no aplica.

Previo al almacenamiento en los cuartos de calor o frío y al momento de la siembra, los bulbos fueron sumergidos durante 20 min en una mezcla de fungicida, Ridomil® (i.a. metalaxil) con dosis de 1.0 $mL.l^{-1}$ y un insecticida, Ambush® (i.a. permetrina) con dosis de 0.8 $mL.l^{-1}$ de agua. Tratamientos realizados para prevenir

la pudrición del bulbo por hongos patógenos y combatir la larva del picudo (*Scyphophorus acupunctatus*), respectivamente. Los bulbos de cada tratamiento se colocaron en jabas plásticas para los tratamientos de calor o bandejas de germinación para los tratamientos de frío.

Los bulbos de los diferentes tratamientos se plantaron en jabas con sustrato a base de tierra de monte y turba en proporción 3:1 (v/v) dentro de un invernadero con cubierta de polietileno en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco – CIATEJ, el día 8 de julio de 2014.

Se sembraron 17 bulbos por cada tratamiento con 4 repeticiones a 3 cm de profundidad 3 hileras, 12 bulbos por jaba plástica.

El riego fue por goteo por dos líneas por cada jaba. Durante el cultivo la fertilización sólida fue aplicada en 2 ocasiones, al inicio de la siembra y 60 dds adicionando 100 g de Osmocote® -por jaba plástica.

Los promedios de temperaturas registradas desde la siembra hasta el final de la cosecha fueron: temperatura máxima 45.4 ºC (±5.3); temperatura mínima 10.1 ºC (±3.4); temperatura promedio 24.5 ºC (±5.4). Las mediciones de humedad relativa registrada fueron: humedad relativa máxima 83% (±21.7); humedad relativa mínima 11.2% (±3.5) y humedad relativa promedio 55.6% (±12.8) (Figura 1).

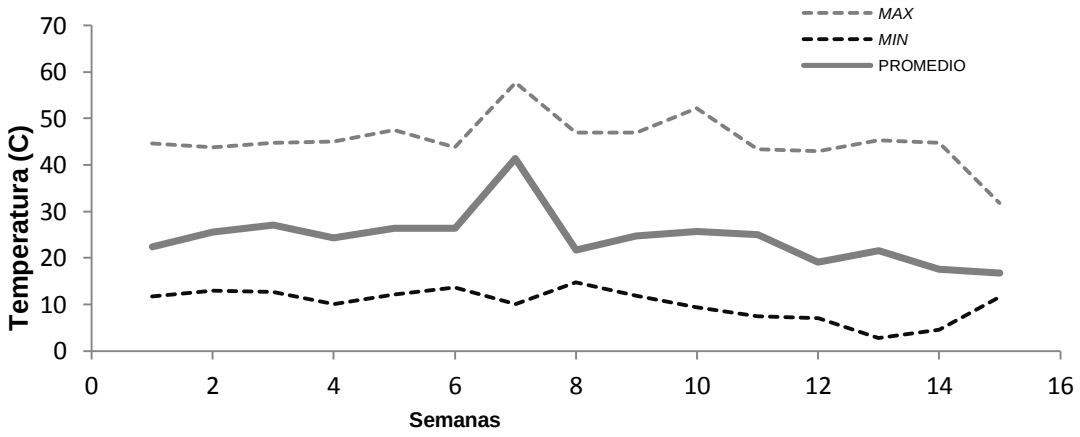

Figura 1. Temperaturas registradas en campo para el cultivo de *P. tuberosa.*

7.2. Experimento de temperaturas en una especie silvestre del género *Polianthes*

Debido a que el número de bulbos de las especies silvestres fue limitado, una vez establecidos los mejores tratamientos de temperatura en los bulbos de *Polianthes tuberosa*, se realizó un segundo experimento (15 de abril de 2015), en donde se emplearon bulbos de *P. pringlei* recolectados de San Cristóbal de la Barranca – Jalisco; estos, los bulbos se dividieron en 4 tratamientos: El tratamiento 1 (T1) el cual consistió en colocar los bulbos a 3.8 ºC (±0.61) por 5 semanas; el tratamiento 2 (T2), consistió en colocar los bulbos a 24.3 ºC (±2.21) durante 5 semanas; el tercer tratamiento consistió en la inmersión de 30 bulbos en ácido giberélico (AG_3) a razón de 200 ppm previa a la siembra (T3). Y un testigo absoluto (T0) como control del experimento. Cada tratamiento consistió en 30 bulbos con 2 repeticiones; excepto para el T0 en el cual solo se usaron 30 bulbos en total (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos aplicados a bulbos de *Polianthes pringlei.*

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Duración (semanas)	Número de bulbos	Cortes Histológicos	Análisis bioquímico	Bulbos plantados
0	**n/a**	**0**	**30**	**18**	**12**	**30**
1	**4**	**5**	**30**	**15**	**12**	**30**
2	**27**	**5**	**30**	**15**	**12**	**30**
3	**n/a**	**0**	**30**	**15**	**12**	**30**

n/a = no aplica

Las temperaturas registradas en campo hasta el día 15 de julio de 2015 fueron: temperatura máxima 43.3 ºC (±7.3), temperatura mínima 12.4 ºC (±2.6) y temperatura promedio 22.3 ºC (±3.9). Las humedad relativa registrada máxima 90% (±8.2), mínima 10% (±0.0) y promedio 62.5% (±18.1) (Figura 2).

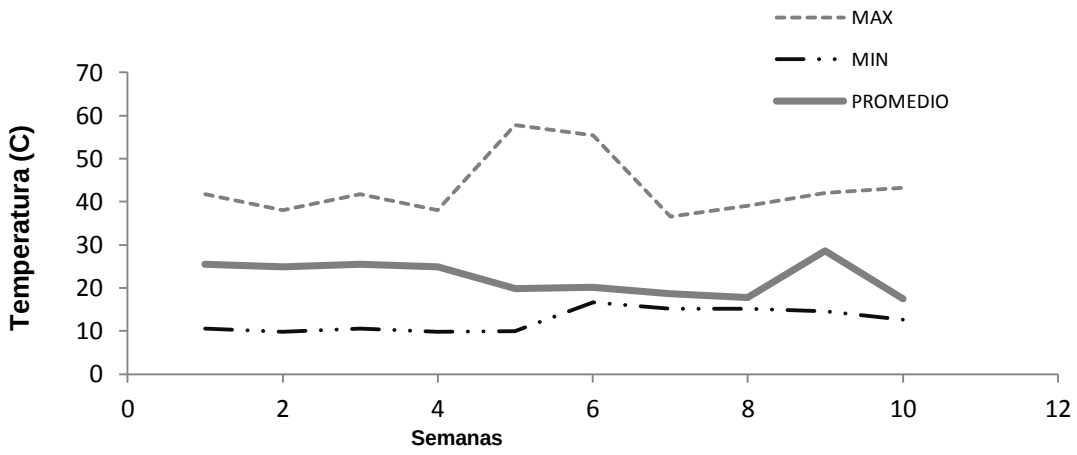

Figura 2. Temperaturas registradas en campo para el cultivo de *P. pringlei*.

Las dos especies de bulbos del género *Polianthes: P. tuberosa y P. pringlei,* fueron sembradas en la primavera en dos años diferentes, con el fin de que la estación climática sea un factor constante entre las dos especies de bulbos estudiados, para posteriormente poder comparar los cambios morfológicos y fisiológicos entre las dos especies, *P. tuberosa* comercial y la especie silvestre *P. pringlei*. Las temperaturas promedio para el año 2014 en el cual se sembraron los bulbos de la especie *P. tuberosa* y en el año 2015 para la especie silvestre *P. pringlei* fueron muy similares, 22.3 ºC y 24.5 ºC, respectivamente ilustradas en la Figura 3. La humedad relativa en estos años tuvo una diferencia promedio del 10%.

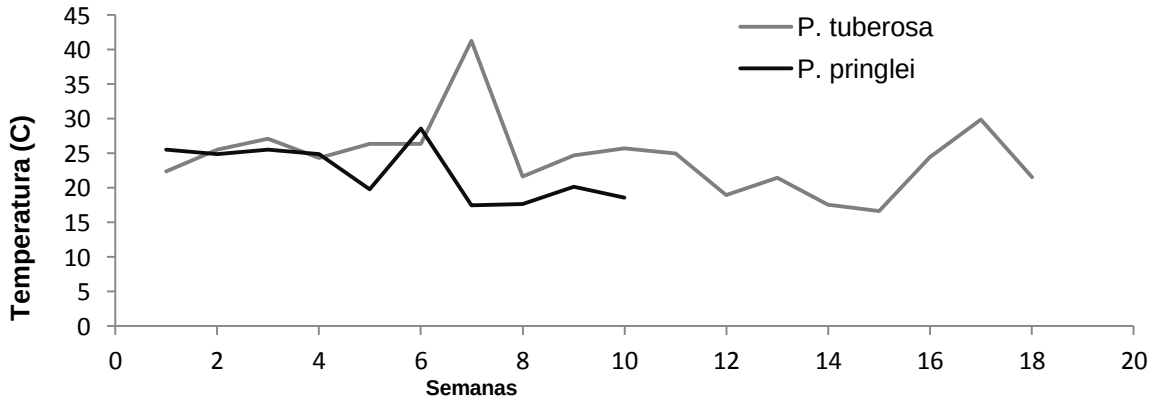

Figura 3. Comparativo de temperaturas promedio en cultivo para *P. tuberosa* y *P. pringlei*.

7.3. Variables evaluadas

7.3.1. Brotación

La brotación vegetativa de los bulbos de *P. tuberosa* y de *P. pringlei* se consideró positiva al ser visible el 50% o más de las hojas en los bulbos plantados por unidad experimental (jaba plástica).

En el caso de *P. tuberosa* se tomaron las siguientes variables:

- Largo de tallo (LT), medido desde la última hoja verdadera en la base de la planta hasta el ápice.
- Largo de espiga (LE): se midió a partir de la primera flor hasta el ápice del tallo.
- Número de flores (NF): se contaron desde la base de la espiga eligiendo flores abiertas y cerradas hasta dos antes del ápice, ya que generalmente estas dos últimas flores más jóvenes no se abren en el nardo.
- Grosor del tallo (GT): medido con vernier en el segundo tercio del tallo.
- Días a floración (DAF): los tallos florecidos se cosecharon cuando presentaron 2 flores abiertas y mediante la resta desde el día de siembra, 8 de julio de 2014, se consideró la variable de días a floración.

7.3.2. Desarrollo floral

Para evaluar el efecto de los tratamientos térmicos en el desarrollo y en la diferenciación del meristemo floral tanto en *P. tuberosa* como en *P. pringlei*, se tomaron muestras de bulbos antes del tratamiento de almacenamiento y posterior a este y a los 30, 60 y dds. Se realizó el corte destructivo de bulbos por cada

tratamiento, basado en la técnica descrita por López *et al.* (2005) con siguientes modificaciones:

1. Se realizó la limpieza del bulbo de los restos de sustrato, se retiraron las hojas envolventes superficiales con cortes longitudinales para evitar romper el plato basal y posterior a ello se retiraron desde la base las hojas envainadoras concéntricas al meristemo apical situado en la parte superior del plato basal.

2. La muestra fue conservada en solución FAA (3.7% formaldehido: 5% ácido acético: 50% etanol) en cuarto frío a 4 ºC hasta su análisis.

3. Después de obtener una muestra pequeña se procedió a realizar bajo el estereoscopio el aislamiento del meristemo limpiando todas sus primordios foliares y se colocó en soluciones de alcohol: agua para la deshidratación en relaciones de 25%, 50%, 75%, 85%, 90% y 100% durante 2-3 min.

4. Se retiraron los residuos de alcohol y se colocaron gotas de solución de 'Hoyers' (7.5 g goma arábiga, 100 g hidrato de cloral, 5 mL glicerol y 30 mL agua destilada) durante 20 – 30 min. Esta solución permite clarificar los tejidos para ser vistos con mayor facilidad en microscopio.

5. Cada muestra se colocó en porta objetos cubierto y se procedió a la observación en microscopio óptico (modelo DMRA2 marca Leica®).

Para determinar cambios morfológicos en los meristemos se midieron la base del meristemo y la altura del meristemo de cada muestra por tratamiento.

Las variables que se midieron fueron Largo de Meristemo (LM) y Ancho de la Base del Meristemo (ABM).

7.4. Análisis de giberelinas por HPLC

7.4.1. Extracción y purificación

El procedimiento para la extracción de giberelinas se basó en lo descrito previamente por Rebers (1994) y Trucker y Roberts (2000) con algunas modificaciones (Figura 4). Para la extracción y purificación de las giberelinas, los platos basales de los bulbos de *P. tuberosa* y bulbos enteros de *P. pringlei* fueron guardados a -80 ºC:

1. 50 g de material (platos basales o bulbos) fueron homogenizados con nitrógeno líquido en un mortero de cerámica. El material se sometió a un proceso de extracción con 200 mL de una mezcla fría de metanol:agua al 80% (v/v), la cual contenía 0.25 g de ácido ascórbico. La extracción se realizó con agitación por 24 h en oscuridad a 4 ºC.

2. El líquido sobrenadante se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min, la fase acuosa se filtró al vacío con filtros VWR Band. Posteriormente las muestras se evaporaron a temperatura de 40 ºC en un rotavapor hasta conseguir volúmenes entre 5 – 10 mL.

3. Una vez evaporadas las muestras se ajustaron a 10 mL con agua destilada a pH= 7.5 – 8.0 con KOH 1N y se realizaron tres lavados con éter de petróleo (3 x 10 mL) para eliminar lípidos, grasas y pigmentos, utilizando para esto un embudo de separación. Se desechó la parte orgánica y se conservó la parte acuosa. Se ajustó el pH a 2.5 con HCl 10N.

4. El residuo acuoso se aforó a 10 mL con agua destilada. En un embudo de separación se pasaron las muestras con acetato de etilo 3 veces por igual

volumen (3 x 10 mL). Se recogió la fase orgánica y se guardó a 4 ºC en oscuridad.

5. Para la purificación de las giberelinas conjugadas, la fase acuosa fue lavada tres veces con butanol (3 x 10 mL), descartando la parte acuosa, se evaporó a 40 ºC, hasta eliminar gran parte del butanol; se adicionaron 10 mL de acetato de sodio al 0.5M y fue ajustado el pH a 4.8.

6. Se agregaron a cada muestra una solución acuosa de enzimas con celulasa (2 mg) y *b*-glucosidasa (2 mg) y se incubó durante 20 h a 37 ºC. Para obtener giberelinas libres y posteriormente ser analizadas. Para separar la fase orgánica de la acuosa se vertió sobre embudo de separación y se recogió la fase acuosa. La parte de butanol se descartó.

7. Se ajustó el pH (2.2 – 3.0) de la fase acuosa proveniente de la hidrólisis (10 mL), posteriormente se pasó con acetato de etilo por 2 veces (2 x 10 mL) y se recogió la parte orgánica. La parte acuosa se descartó.

8. Es muy importante que en la fase orgánica de acetato de etilo no presenten restos de sustancias lipídicas ya que al llevar a evaporación, las mismas subirán el punto de evaporación y no será posible reducir el volumen de la muestra a lo requerido para los siguientes procesos. Para evitar esta contaminación con sustancias no polares, se dejó en reposo por 48 h a temperatura de 4 ºC y posteriormente se recogió la parte superior, descartando la fase asentada en los frascos.

9. Las dos partes de acetato de etilo se mezclaron obteniendo un volumen de aproximadamente 50 mL. El cual se evaporó en rotavapor hasta conseguir volúmenes entre 0.25 – 0.5 mL.

10. A cada muestra se agregaron 300 μl de metanol y se aforó a 1 mL con agua destilada. Se guardaron a -20 ºC en oscuridad.

La coloración en las muestras puede causar ruidos muy altos en el análisis para HPLC ya que su absorbancia es muy alta, para eliminar el material colorante, los extractos se pasaron a través de una columna de intercambio iónico.

11. Se utilizó una columna Oasis Max 1cc (Waters®) la cual se acondicionó con 1 mL de metanol para luego equilibrar con 1 mL de agua para HPLC y se colocó la muestra. La columna se lavó con una solución de 1 mL de hidróxido de amonio al 5% en metanol-agua (v/v). El eluido obtenido se desechó. Finalmente las giberelinas se eluyeron con una solución de 1 mL de ácido fórmico al 2% en metanol y se recogió el eluido en un vial color ámbar.

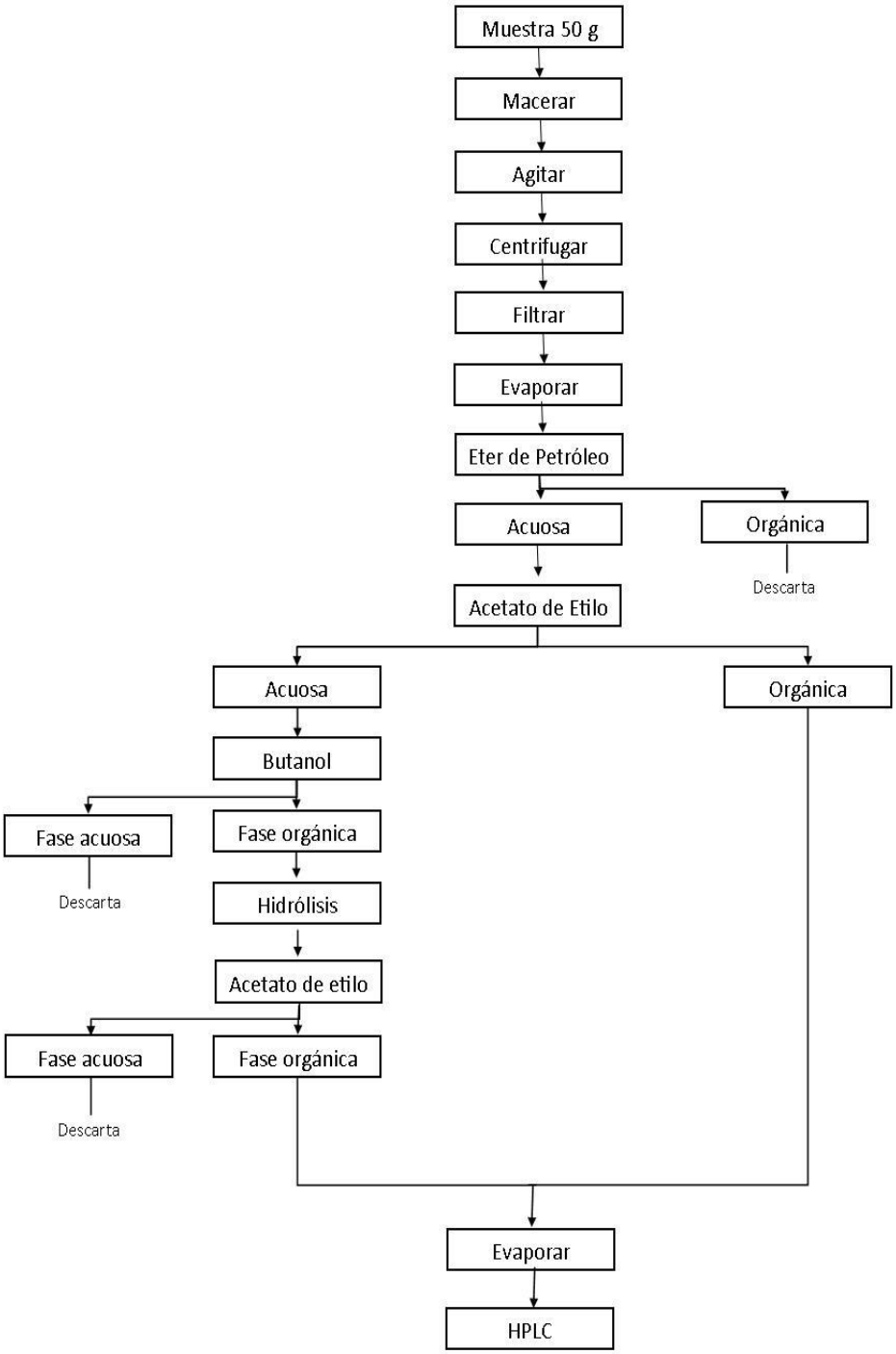

Figura 4. Extracción y purificación de giberelinas en bulbos de *Polianthes.* Adaptado de Rebers (1994), Trucker y Roberts (2000).

7.4.2. Separación, identificación y cuantificación

HPLC Varian ProStar Modelo 230 equipado con un automuestreador Varian ProStar Modelo 420 y provisto de una columna Zorbax C18 con tamaño de particula 10 µm, diámetro 4.6 mm y longitud 150 mm (Agilent). El horno operó a una temperatura de 40 ºC (Horno ProStar Modelo 510). La duración del método fue de 30 min. Las fases móviles consistieron en agua acidificada con ácido fosfórico pH 2.84 solvente (A) y metanol grado cromatográfico como solvente (B). El flujo fue de 1.0 $mL.min^{-1}$ con elusión con gradiente 10% metanol a 70% (Cuadro 5). Se inyectó un volumen de 50 µL y la determinación se realizó a una longitud de onda de 206 nm.

Cuadro 5. Tiempo y gradiente de fases móviles para identificación de giberelinas en *P. tuberosa* por HPLC.

Tiempo	Fase móvil A	Fase móvil B
1.00	90	10
15.00	30	70
20.00	30	70
25.00	30	70
30.00	90	10

Cada estándar de giberelina: ácido giberélico (AG_3) obtenido de Sigma- Aldrich; GA_1, GA_4 y GA_7 provenientes de Olchemim; fue disuelto en metanol 80% en matraz ámbar de 10 mL obteniendo una solución individual con concentración de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ para la GA_3 y 5000 $\mu g.mL^{-1}$ para la GA_1, GA_4 y GA_7. Para cada solución estándar de las giberelinas, alícuotas fueron transferidas a un volumen de 10 mL para obtener una concentración de 100 $\mu g.mL^{-1}$. Con esta solución se hicieron 8 diluciones de la mezcla de los 4 tipos de gibelinas hasta llegar a concentraciones entre 0.5 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 – 15 y 20 $\mu g.mL^{-1}$ - para realizar la

curva de calibración de cada una (Cuadro 12). 50 *u*l de las soluciones fueron inyectadas en HPLC. Una solución de 30 $\mu g.mL^{-1}$ para cada giberelina fue inyectada para obtener el tiempo de retención (Cuadro 12 y Figura 16).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Brotación

Los bulbos tratados con calor, testigo y tratamiento con ácido giberélico evidenciaron la aparición de sus hojas a la primera semana de siembra (Figura 5) y una semana después los bulbos tratados con frío, independientemente de las semanas de almacenamiento.

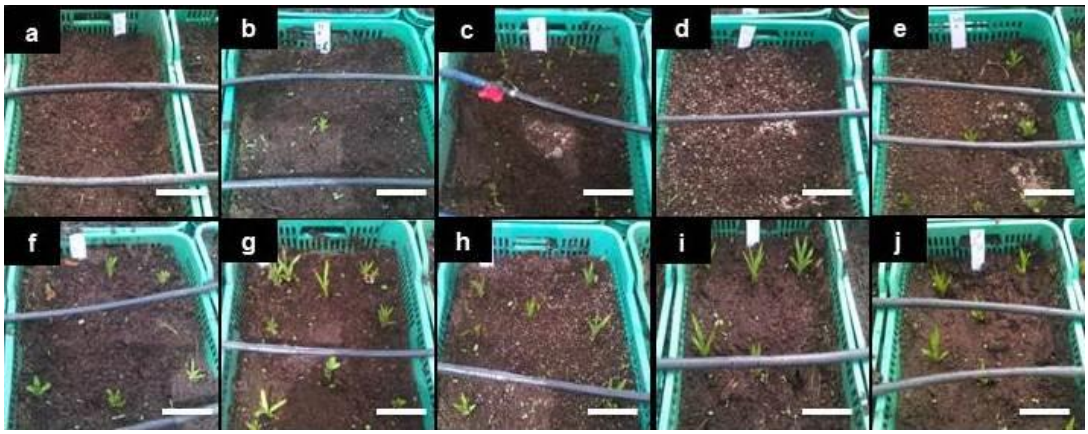

Figura 5. Brotación a la primera semana de siembra de los diferentes tratamientos en *P. tuberosa*. **a, b, c, d**: Bulbos almacenados en frío (4 ºC. 7, 6, 5 y 4 semanas respectivamente). **e.** testigo. **f, g, h, i**: Tratamientos de calor (27 ºC. 7, 6, 5, y 4 semanas respectivamente). **j**. Bulbos tratados con AG_3. Escala 10 cm.

A partir de la quinta semana de almacenamiento, en los bulbos tratados con calor se observó la emergencia de brotes, los tratamientos menores a cinco semanas de almacenamiento no brotaron. En el caso de los tratamientos de frío, no se evidenció brotación de los bulbos dentro del cuarto frío.

Dhua *et al.* (1987) encontraron también diferencias en bulbos sembrados de *P. tuberosa* con almacenamiento previo a la siembra. Bulbos almacenados a temperaturas menores a 4 ºC tardaron más tiempo en brotar y se retrasó más al colocarlos a las mismas temperaturas en períodos de 30 d. Sin embargo

temperaturas de 10 ºC durante 30 días resultó beneficiosas para la brotación y la floración de nardo en relación a 4 ºC.

El mismo efecto de diferencias en el almacenamiento térmico se encontró en un trabajo realizado en Japón por Huang *et al.* (1995). En el cual mientras mayor fue la temperatura de almacenamiento y a mayor tiempo de almacenamiento, la brotación en bulbos de nardo fue más acelerada aunque afectándose el peso seco de los bulbos debido a una mayor tasa de transpiración.

El número de hojas por especie está determinado genéticamente, en la cual la temperatura no influye en esta característica de la especies, sin embargo el momento de iniciación floral puede ser considerado por la tasa de crecimiento bajo la influencia directa de la temperatura (Rees, 1966) para el caso de *P. tuberosa* se observó alrededor de 14 pares de hojas al presentar la espiga floral.

8.2. Iniciación floral en *Polianthes tuberosa*

El período de la diferenciación floral ha sido reportado en varias especies, sin embargo existen pocos reportes acerca del desarrollo meristemático en plantas del género *Polianthes*. La mayoría de los estudios se centran en las temperaturas, sacarosa, hormonas u otros factores implicados en el desarrollo de la flor. Sin embargo no se han realizado estudios sobre los cambios morfológicos y fisiológicos que se producen en los meristemos apicales en el interior de los bulbos. La estructura del meristemo apical de tulipán fue descrita por primera vez por Sass (1944) durante la fase vegetativa y la fase de diferenciación floral.

En la Figura 6 se observa las diferentes estructuras del meristemo apical en bulbo de *P. tuberosa* realizado en base a fotografías de microscopio óptico (Leica® DMR-A2): el ápice meristemático se encuentra en el eje principal y está muy profundo solo por encima del plato basal en rangos muy pequeños de largo y ancho. El domo apical es una cúpula convexa entre 100 – 125 μm en su parte semicircular.

El ápice del meristemo está protegido por una túnica que consiste en una sola capa de células y durante las fases mitóticas de crecimiento es visible ya que posee 3 capas de células dividiéndose de manera anticlinal. Los primordios foliares son resultado de la primera capa de la división celular del corpus y envueltos por 3 o 4 capas de células. El domo consiste en dos capas celulares estrictamente anticlinales (Rees, 1966; Kamenetsky y Okubo, 2013).

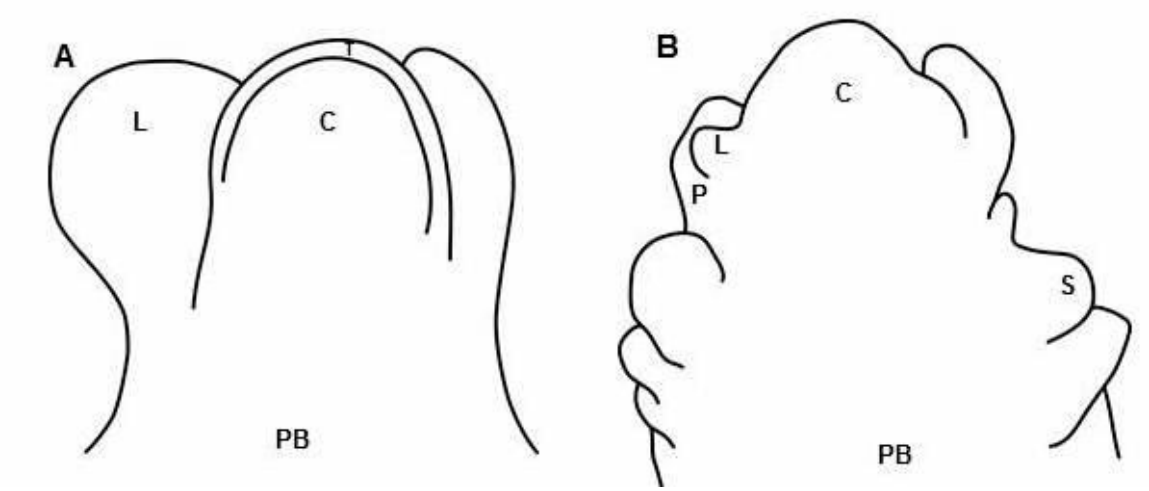

Figura 6. Ilustración de las estructuras del meristemo apical de *P. tuberosa*. **A.** Meristemo vegetativo. **B.** Formación de primordios florales. T= túnica; C= corpus; L= primordio foliar; P= primordio del perianto; S= sépalo; PB= plato basal.

Las etapas de desarrollo meristemático se muestran en la Figura 7, en las cuales el domo vegetativo comienza a formar yemas florales en las axilas de las hojas. Para Chang *et al.* (1998) los sépalos son los primeros órganos florales formados en las axilas de las hojas en el meristemo. En la etapa vegetativa el meristemo apical generalmente es plano e inicia sus primordios foliares desde la periferia hacia el centro; durante la iniciación de la flor el meristemo apical cesa la producción de hojas y se concentra en el desarrollo reproductivo, pasando de crecimiento monopodial a simpodial (Kamenetsky y Okubo, 2013) lo que concuerda con Chang *et al.* (1998), que indicaron la formación de sépalos.

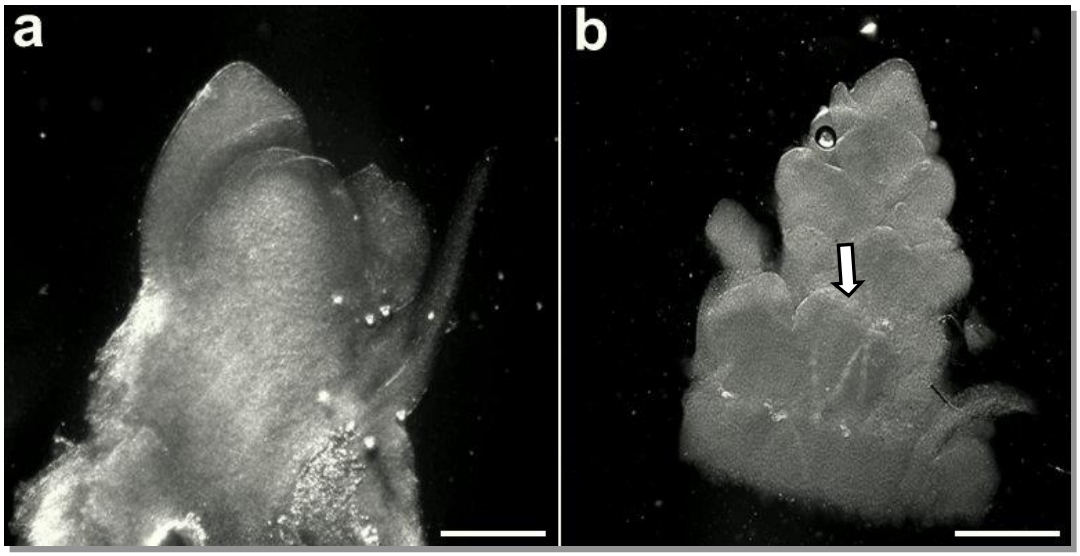

Figura 7. Transición meristemática en *P. tuberosa*. **a.** Etapa vegetativa a los 0 dds. **b.** Etapa de Iniciación floral y diferenciación floral a los 30 dds. Flecha indica formación de sépalos. Escala 100 μm

No se encontraron diferencias significativas en la variable largo del meristemo (p=0.343) a los 0 dds con relación al testigo (T0); sin embargo para la variable ancho de la base del meristemo hubo diferencias estadísticas (p=0.0001) 0 dds entre los bulbos sin tratamiento térmico (T0) con relación a los bulbos tratados con frío o calor. No se evidenciaron diferencias entre bulbos tratados con frío o calor, ni tampoco diferencias entre el tiempo de almacenamiento (Cuadro 6). A los 0 dds en los cortes histológicos no se observó en ningún tratamiento diferenciación floral u organogénesis (Figura 8), lo que sugiere que la inducción floral para *P. tuberosa* comienza con el engrosamiento y aumento de diámetro en el meristemo apical dentro del bulbo.

Cuadro 6. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. tuberosa* en el tamaño del meristemo a los 0 dds.

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Tiempo (semanas)	Largo de meristemo (*µm*)	Ancho de la base del meristemo (*µm*)	
0	n/a	0	113.282	69.010	*a*
1	4	7	150.210	237.450	*bc*
2	4	6	141.000	213.007	*bc*
3	4	5	136.530	236.610	*bc*
4	4	4	165.863	226.056	*bc*
5	27	7	166.303	244.233	*bc*
6	27	6	143.913	244.320	*bc*
7	27	5	188.077	261.950	*c*
8	27	4	184.690	188.100	*b*

Valores promedio con la misma letra son estadísticamente iguales. Duncan α= 0.05
n/a = no aplica.

En la Figura 8 se observa que los meristemos apicales después del almacenamiento térmico de frío o calor se encuentran en la fase de transición floral, sus domos tienen forma convexa y no presentan formación de primordios florales en estado inicial. No se observaron cambios morfológicos de los meristemos con relación al testigo.

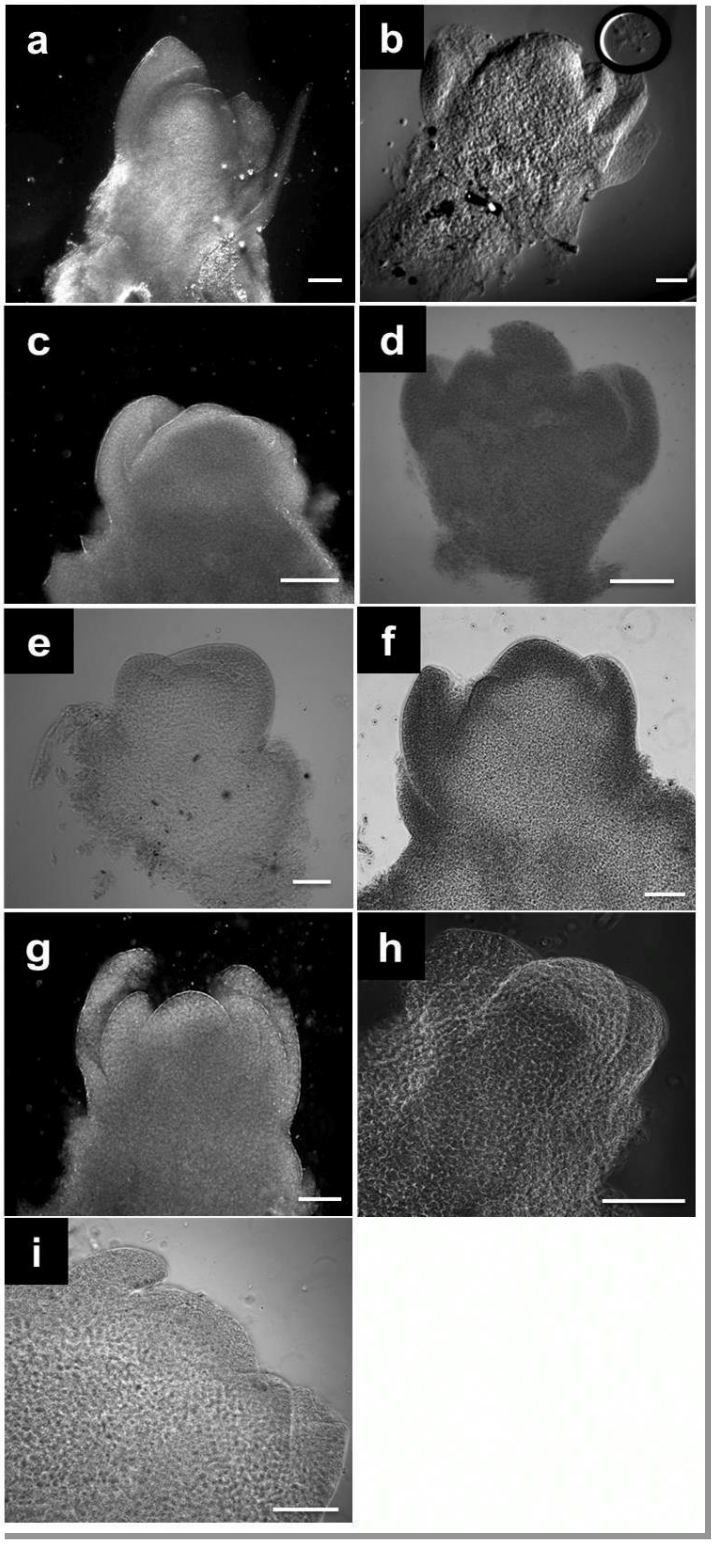

Figura 8. Desarrollo meristemático en *P. tuberosa* después del almacenamiento térmico (0 dds). **a.** Testigo. Tratamientos con frío 7, 6, 5, 4 semanas respectivamente (**b,c,d,e**). Tratamientos con calor 7, 6, 5, 4 semanas respectivamente (**f,g,h,i**). Escala =100 μm.

Se evidenciaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el largo del meristemo (p=0.0005) con relación al testigo (T0), sin embargo no hay claras diferencias a los 30 dds entre grupos de tratamientos. En la variable de ancho de la base del meristemo existieron aumentos en el tamaño de los tratamientos T1 y T8 con relación al testigo (p=0.0305) (Cuadro 7). Kamenetsky y Okubo (2013) indican que es una regla general la diferenciación floral en geofitas, la cual se ve forzada por temperaturas cálidas; en cambio la vernalización es beneficiosa para la inducción de la flor. En iris temperaturas de 30 ºC promueven la diferenciación mientras que para tulipán temperaturas cálidas favorecen la iniciación floral y posterior a ello, someterlos a frío favorece la elongación floral (De Hertogh y Le Nard, 1993).

A los 30 dds, el meristemo del testigo absoluto obtuvo valores similares de largo de meristemo y ancho de meristemo con relación a los tratamientos térmicos y el tratamiento con ácido giberélico, exceptuando los meristemos de los tratamientos que han formado sus primordios foliares definidos, como son el caso de T1, T7 y T8.

Cuadro 7. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. tuberosa* en el tamaño y morfología del meristemo a los 30 dds.

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Tiempo (semanas)	Largo de meristemo (µm)		Ancho de la base del meristemo (µm)	
0	n/a	0	340.772	*a*	372.523	*a*
1	4	7	714.410	*ab*	891.045	*ab*
2	4	6	353.880	*a*	362.480	*a*
3	4	5	211.090	*a*	265.930	*a*
4	4	4	282.580	*a*	340.310	*a*
5	27	7	633.840	*ab*	706.230	*a*
6	27	6	575.769	*ab*	583.209	*a*
7	27	5	1476.990	*bc*	1786.930	*d*
8	27	4	1654.630	*c*	1662.060	*bc*
9	n/a	0	307.913	a	378.123	a

Valores promedio con la misma letra son estadísticamente iguales. Duncan α= 0.05.
n/a = no aplica.

En la Figura 9 se muestran la morfología de los meristemos apicales de los bulbos en los diferentes tratamientos. En el testigo (T0) (Figura 9a) y tratamiento con ácido giberélico (T9) (Figura 9j) no se observan ningún cambio morfológico. En los tratamientos con frío se observan cambios menores de formación de los primeros órganos florales, con excepción del T1 (Figura 9b) el cual tiene una notable diferenciación floral. En todos los meristemos de los tratamientos de calor existen claras diferencias en la formación de órganos florales. Lo que sugiere que el efecto del tratamiento de calor además de ayudar a una pronta brotación también define en menor tiempo los primordios florales con relación a los otros tratamientos. Esta condición se puede atribuir a que estos tratamientos recibieron el estímulo de floración ya que los fitocromos, son receptores de luz y juegan un rol importante en la inducción floral sobre todo en plantas perennes y anuales en las cuales induce la formación de botones florales y el comienzo en la aparición de brotes; este estímulo es recibido en las hojas y tiene su efecto en los meristemos. A este fenómeno de

recibir el estímulo en las hojas y transmitirlo sobre el meristemo apical se refiere Nitsch (1957) en la cual concluyó que tiene un impulso transmisible que se sintetiza en las hojas y se expresa en el ápice.

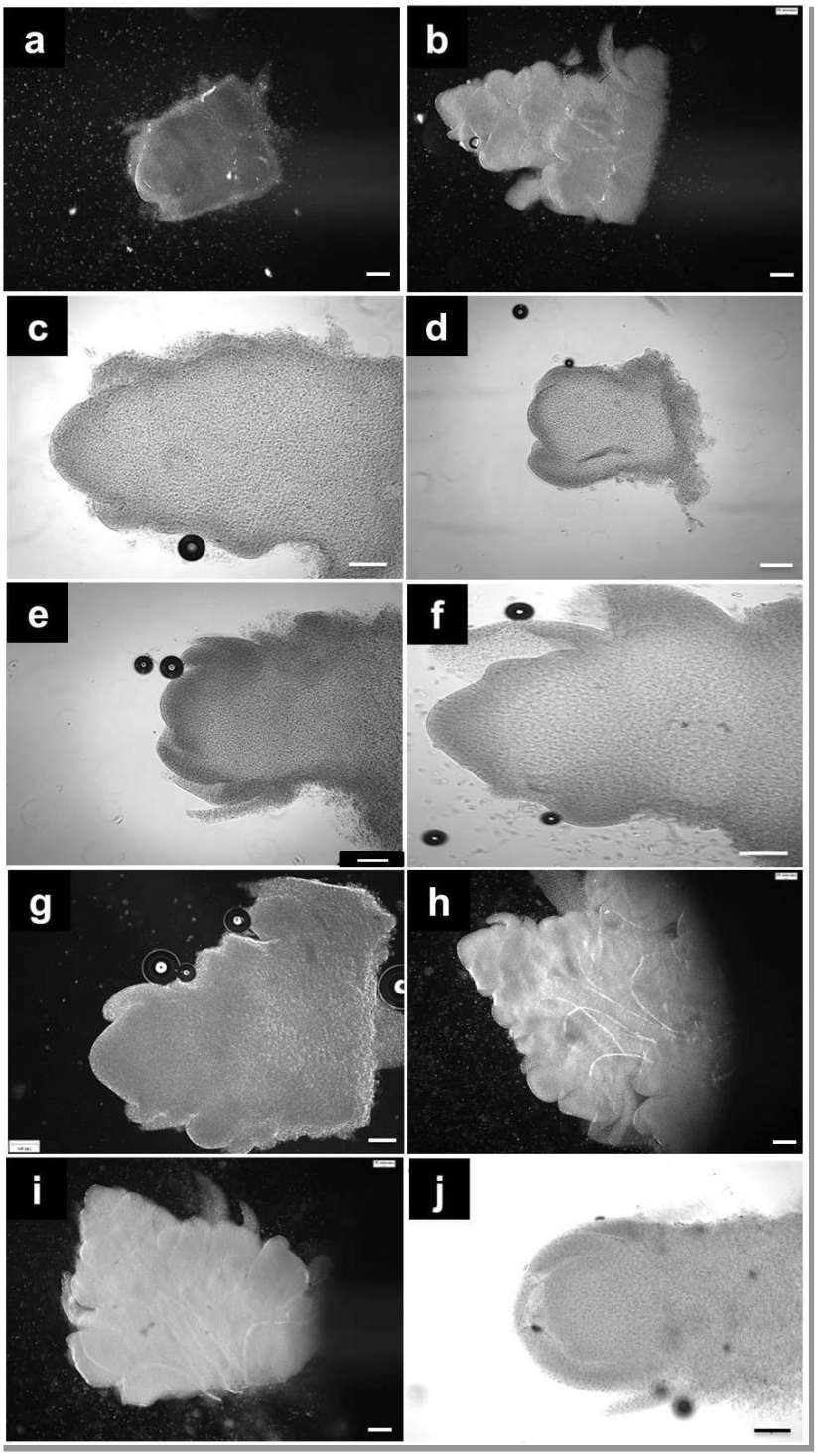

Figura 9. Desarrollo meristemático en *P. tuberosa* a los 30 dds. **a.** Testigo. Tratamientos con frío 7,6,5,4 semanas respectivamente (**b,c,d,e**). Tratamientos con calor 7, 6, 5, 4 semanas respectivamente (**f,g,h,i**). **j.** Tratamiento con AG_3. Escala 100 μm.

Cada tratamiento comparando entre 0 y 30 dds, presentó crecimiento en el largo del meristemo (Figura 10), lo que sugiere que pasaron de una etapa vegetativa a iniciación floral, en algunos casos con mayores tamaños. Los bulbos tratados con frío tuvieron el menor crecimiento de longitud meristemática, a excepción del tratamiento con frío a 7 semanas de almacenamiento (T1). Se omiten los valores de los bulbos con ácido giberélico (T9) a los 0 dds, ya que no recibieron tratamiento térmico previo a la siembra. Kosugi y Kimura (1961) concluyeron que para bulbos de *P. tuberosa* las altas temperaturas son requeridas para la iniciación floral, diferenciación y desarrollo. Las temperaturas mínimas de producción están a los 21 ºC, temperatura en la cual la brotación fue lenta pero la floración se aceleró.

Existen especies bulbosas en las que la floración es más rápida a altas temperaturas de almacenamiento como por ejemplo en tulipán, Jacinto, iris y narciso. Las altas temperaturas favorecen al crecimiento temprano y la iniciación floral. Las causas del efecto beneficioso con temperaturas altas no son claras. En Iris a temperaturas altas se promueve la formación de flores, fase de prefloración. Este requisito de temperatura es normalmente satisfecho por un verano cálido pero no por uno fresco, lo que sugiere, que un tratamiento a altas temperaturas es esencial después de un verano fresco (Chouard, 1960).

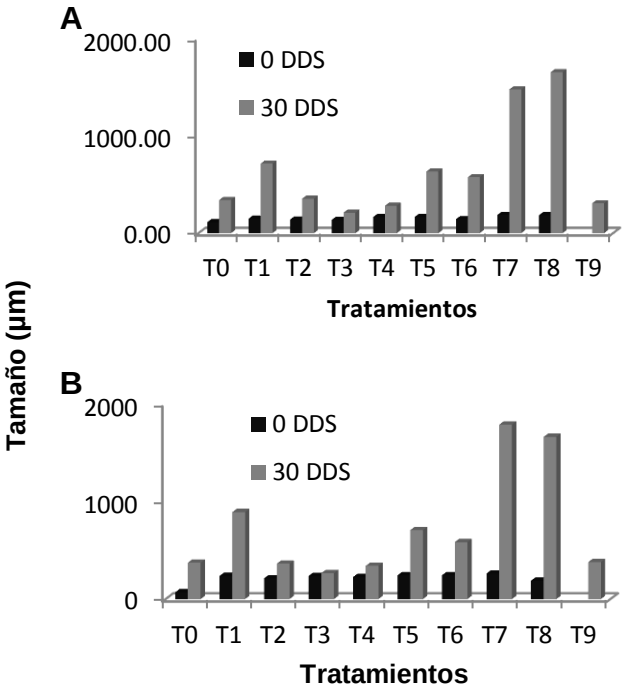

Figura 10. Efecto de los tratamientos térmicos en el tamaño de los meristemos de los bulbos de *P. tuberosa* a los 0 y 30 dds. **A.** Largo del meristemo. **B.** Ancho de la base del meristemo.

Los bulbos con tratamiento térmico de frío o calor presentaron una modificación en la morfología del meristemo apical dentro del bulbo a los 30 dds, sin importar el tiempo de almacenamiento ni la temperatura tratada.

El someter a frío o calor a los bulbos tuvo un efecto positivo ya que presentaron aumento de tamaño y aumento de diámetro (ancho de la base) lo que sugiere que se estimularon para estar en fase de transición floral. En la Figura 10 se observa que los tratamientos almacenados a 27 ºC, presentaron un crecimiento mayor en comparación a los otros 3 grupos de tratamientos. Es posible que la diferenciación floral encontrada a los 30 dds en los tratamientos térmicos dependa de estímulos medioambientales y no sea por efecto de estímulos endógenos en su totalidad o por efecto del almacenamiento térmico (Figura 9) tal como sugieren Kamenetsky y

Okubo (2013), a pesar de este fenómeno se encontraron primordios foliares en formación entre estas etapas de crecimiento.

De Hertogh y Le Nard (1993) mencionan que los meristemos que se encuentran en etapa de reposo presentan un diámetro meristemático de 150 μm y un largo del meristemo apical entre 80 - 100 μm, lo que coincide con lo observado en esta investigación con una media de 113.282 μm (Figura 7). En la etapa de transición los mismos autores sugieren que el ancho de la base del meristemo tendría dimensiones de 300 – 400 μm, los cuales en las mediciones obtenidas en el presente estudio.

8.3. Iniciación floral en *Polianthes pringlei*

La brotación de los bulbos tratados con calor (T2) fue a los 28 dds mientras que el testigo y el tratamiento con ácido giberélico (T3) brotaron a los 47 dds. Los bulbos tratados con frío (T1) al termino del experimento a los 90 dds, no se evidenció brotación alguna.

Se analizaron los tamaños y morfología de los meristemos en bulbos previo y después del tratamiento térmico. Posteriormente fueron analizados a los 30 y 60 dds. Solo se encontraron meristemos internamente en bulbos tratados con frío a los 90 dds.

No se encontraron diferencias a los 0 dds en el largo del meristemo (p= 0.12) ni ancho de la base del meristemo (p= 0.23) con relación al testigo en bulbos sometidos a tratamientos térmicos de frío o calor (Cuadro 8). El tratamiento con inmersión en ácido giberélico (T3) no fue analizado a los 0 dds ya que no fue mantenido en cuartos de almacenamiento.

Cuadro 8. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. pringlei* a los 0 dds.

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Tiempo (semanas)	Largo de meristemo (µm)	Ancho de la base del meristemo (µm)
0	n/a	0	117.064	156.913
1	4	6	107.921	168.281
2	27	6	162.204	156.591

Valores promedio con la misma letra son estadísticamente iguales. Duncan α= 0.05.
n/a = no aplica

Al no encontrarse diferencias en tamaños de meristemo se identifica que las 6 semanas de almacenamiento no fueron suficientes para inducir a un crecimiento del meristemo apical de los bulbos. No se evidenciaron cambios morfológicos a los 0 dds de los bulbos tratados con frío o calor con relación al testigo absoluto (T0) (Figura 11).

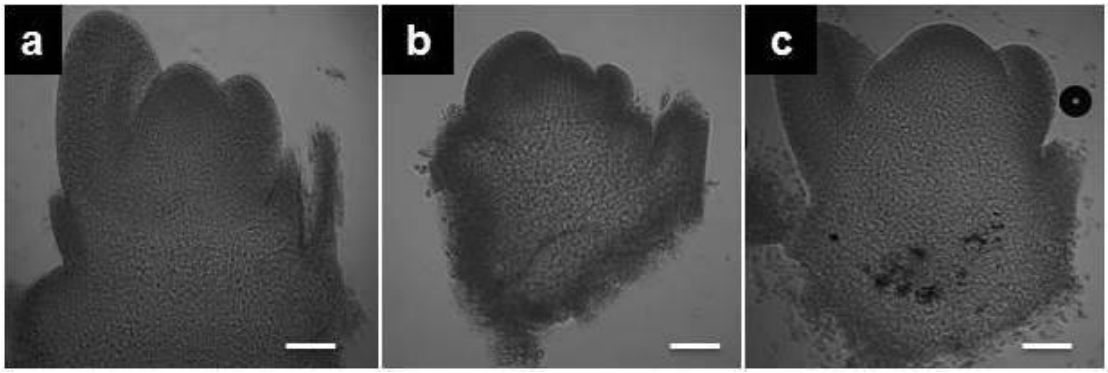

Figura 11. Meristemos apicales en bulbos de *P. pringlei* a los 0 dds. **a**. Meristemo pretratamiento. **b**. Meristemo tratado con frío 6 semanas. **c**. Meristemo tratado con calor 6 semanas. Escala 100 µm.

A los 30 dds el tamaño de los meristemos en largo y ancho de la base presento un crecimiento, sin embargo no existieron diferencias significativas entre los

tratamientos (Cuadro 9). En los bulbos tratados con temperaturas de calor a los 30 dds se observaron cambios en su morfología, comenzando con la formación de sus primordios foliares en estado muy inicial (Figura 12). Lo que no fue observado en los bulbos testigo, bulbos con tratamiento de frío ni en bulbos con inmersión en ácido giberélico.

Cuadro 9. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. pringlei* a los 30 dds

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Tiempo (semanas)	Largo de meristemo (µm)	Ancho de la base del meristemo (µm)
0	n/a	0	218.935	249.351
1	4	6	207.182	244.168
2	27	6	248.815	334.544
3	n/a	0	157.822	225.443

Valores promedio con la misma letra son estadísticamente iguales. Medias Duncan α= 0.05.
n/a = no aplica

A los 28 dds se evidenció brotación en el T2, bulbos tratados con calor, sin embargo en los otros tratamientos existió un crecimiento en largo y ancho de la base con relación a los bulbos a los 0 dds a pesar que la brotación fue tardía o en el caso de los bulbos tratados con frío no existió desarrollo vegetativo. El crecimiento en tamaño meristemático no tuvo relación con la brotación de los bulbos.

Existen diferencias entre *P. pringlei* y *P. tuberosa* ya que al parecer en *P. pringlei* no está totalmente ligada a la emergencia de las plantas, puede existir floración con un mínimo de hojas o formar su espiga floral cuando tenga varios pares de hojas formadas. En *P. tuberosa* los cambios a inducción floral desde la etapa vegetativa es llevada a cabo en las hojas mediante la activación de señales genéticas, la cual no es afectada por el fotoperíodo, días cortos o días largos, existiendo una fuerte correlación lineal entre el tiempo de floración y el número de hojas en las plantas de nardo (Chang *et al.*, 1998). Huang *et al*(1995) indicaron que para que la iniciación floral ocurra en *P. tuberosa* deben formarse al menos 4 pares de hojas sin

interrupción en el crecimiento bajo condiciones de temperatura cálida y humedad suficiente.

La inducción floral en *P. tuberosa* y *P. pringlei*, ocurre en el meristemo apical en el interior del bulbo, mientras que la iniciación y la diferenciación floral emerge a la parte superficial como primordio de espiga hasta alcanzar el tamaño total y de ahí en adelante comienza la formación de la estructura de la flor. La iniciación floral y la diferenciación floral se evidenciaron en las dos especies de *Polianthes* que ocurre a partir del día 30 después de la siembra y no ocurre si no existe formación de hojas verdaderas y fotosintéticamente activas.

En *Lillium*, el meristemo en el interior del bulbo no realiza cambios morfológicos sino que luego de cierta edad en el crecimiento de la planta, el meristemo vegetativo apical se transforma a reproductivo en la parte superficial de la planta y el vástago floral con su meristemo apical se mantiene vegetativo hasta que las condiciones para florecer sean las adecuadas. En tulipán la inducción floral es más parecida a lo visto en esta investigación, con la diferencia que desde la etapa vegetativa hasta la diferenciación floral ocurre en el interior del bulbo después del tratamiento térmico inductor de calor, por lo que los bulbos antes de brotar ya adquieren la capacidad para florecer (Kamenetsky y Okubo, 2013).

En *Allium*, después de la formación de 6 o 7 hojas, expuestas a condiciones ambientales adecuadas, el meristemo apical del ajo se convierte en reproductivo. Este cambio en la mayoría de especies de *Allium* ocurre antes de la elongación del escapo, sin embargo la diferenciación floral de sus primordios comienza solo después de que el meristemo ha alcanzado una longitud entre 5 – 7 mm y el diámetro del ápice alrededor de 0.5 mm (Kamenetsky y Rabinowitch, 2001).

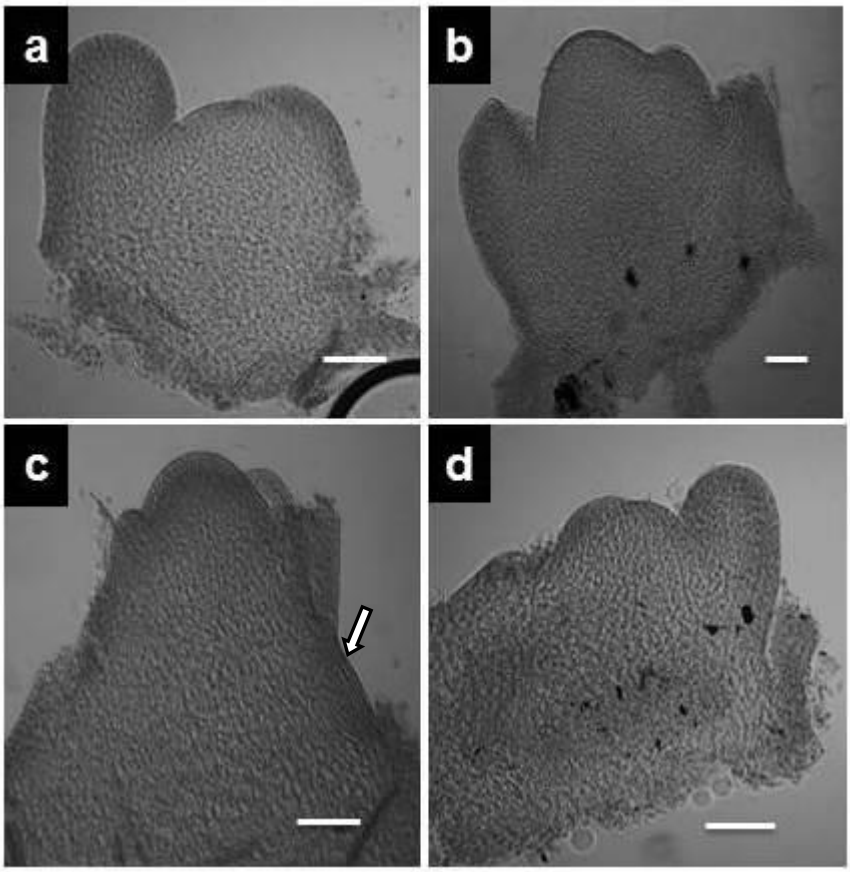

Figura 12. Desarrollo meristemático en *P. pringlei* a los 30 dds. **a.** Testigo. **b.** Tratamiento con frío. **c.** Tratamiento con calor. **d.** Tratamiento con AG_3. Flecha indica formación de sépalos. Escala 100 *µm*.

A los 60 dds no se encontraron diferencias significativas en el ancho de la base del meristemo, sin embargo el crecimiento en el T2, con relación a los otros tratamientos fue mayor significativamente. En el largo del meristemo no se evidenciaron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

En base a lo encontrado en *P. tuberosa* se puede concluir que el crecimiento meristemático conlleva a una transición floral tal como sugirieron De Hertogh y Le Nard (1993), con relación a los 30 dds ya que siguió incrementándose el crecimiento en todos los tratamientos sin importar las condiciones de almacenamiento ni la inmersión en ácido giberélico (Figura 14).

Cuadro 10. Efecto de los tratamientos térmicos en bulbos de *P. pringlei* a los 60 dds en el tamaño de los meristemos apicales.

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Tiempo (semanas)	Largo de meristemo (µm)	Ancho de la base del meristemo (µm)
0	n/a	0	279.682	287.656
1	4	6	345.379	441.382
2	27	6	340.642	528.357
3	n/a	0	294.194	314.115

Valores promedio con la misma letra son estadísticamente iguales. Duncan α= 0.05
n/a = no aplica

No se evidenciaron diferencias morfológicas ni diferenciación floral de manera clara en el análisis de los bulbos de los tratamientos de calor, frío, ácido giberélico y control. Se puede apreciar un ligero cambio de forma en el meristemo en el tratamiento de calor (Figura 13c) y con relación a lo que encontraron Chang *et al.* (1998) se sugiere que en esta investigación también se observó la aparición de un primordio prematuro de formación floral. Se deberá realizar varios análisis posteriores entre 60 y 90 dds para identificar el tiempo en que se produce la organogénesis interna definida en los bulbos de *P. pringlei*.

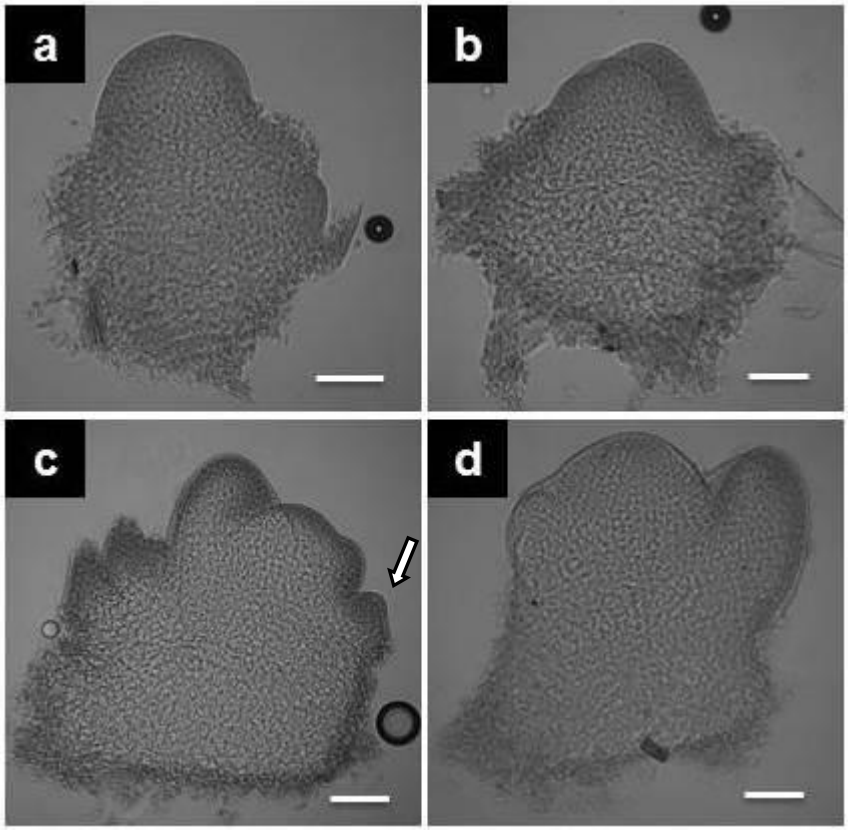

Figura 13. Desarrollo meristemático en *P. pringlei* a los 60 dds. **a.** Testigo. **b.** Tratamiento con frío. **c.** Tratamiento con calor. **d.** Tratamiento con AG_3. Flecha indica formación de sépalos. Escala 100 *µm***.**

El crecimiento meristemático mayor fue encontrado en bulbos con tratamiento de calor (T2), seguidos de los bulbos tratados con frío (T1), testigo absoluto (T0). No existen comparaciones de crecimiento entre los 0 y 30 dds en el T3, ya que no recibió tratamiento previo de almacenamiento antes de la siembra, únicamente se realizó la comparación de crecimiento entre los 30 y 60 dds para este tratamiento (Figura 14). A los 60 dds se encontró que los bulbos tratados con calor tienen similar longitud y mayor ancho de la base del meristemo, igual que lo encontrado en *P. tuberosa*, tienen mayor tamaño meristemático en la iniciación floral en comparación con el resto de los tratamientos. Tiene relación con la precocidad de floración en este tratamiento (T2).

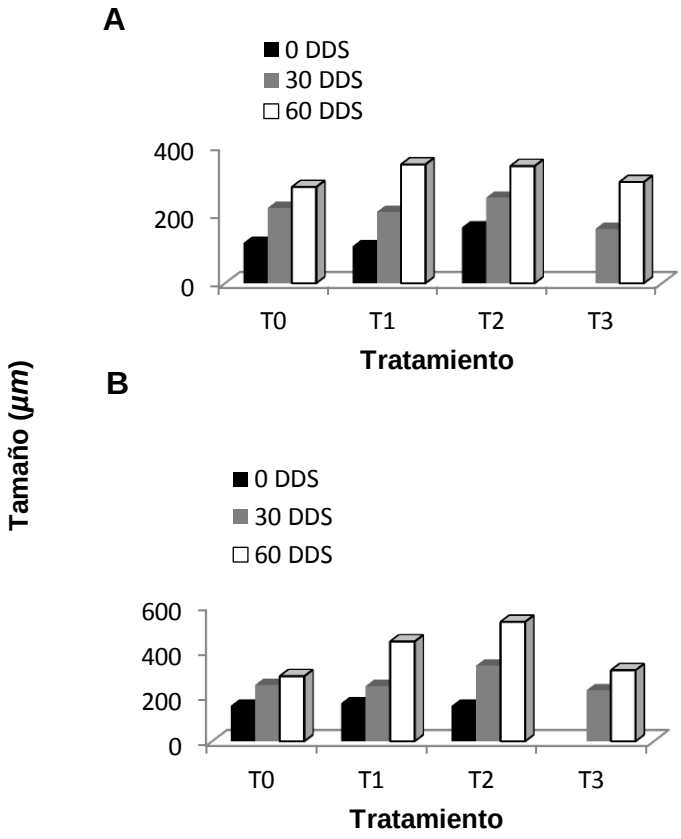

Figura 14. Efecto de los tratamientos térmicos en el tamaño de los meristemos de los bulbos de *P. pringlei* a los 0 y 30 dds. **A.** Largo del meristemo. **B.** Ancho de la base del meristemo. Barras oscuras 0 dds. Barras grises 30 dds. Barras blancas 60 dds.

Los caracteres florales en *P. pringlei* no fueron evaluados. La floración en las plantas del tratamiento térmico de calor (T2) fue a los 69 días. Los demás tratamientos no presentaron formación de espiga floral hasta el término de los 90 dds (datos no mostrados).

A los 90 dds únicamente se encontró el meristemo en el interior del bulbo en el tratamiento con frío (T1). En los demás tratamientos los meristemos no se encontraron dentro de las catáfilas envolventes del bulbo.

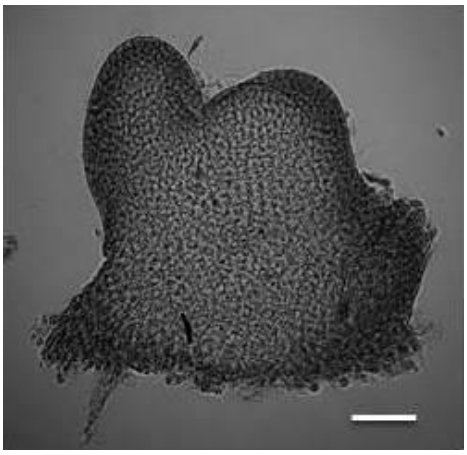

Figura 15. Meristemo T1 de *P. pringlei* a los 90 dds.

Por lo encontrado en esta investigación del crecimiento meristemático en *P. pringlei* a los 0 dds con rangos menores a 200 *µm* y desde los 30 dds superando estos valores, comparando con lo encontrado en *P. tuberosa*, sin importar el tipo de tratamiento, se puede afirmar que los bulbos de *P. pringlei* analizados se encontraron en transición hacia la iniciación floral. Cabe mencionar que los calibres de los bulbos en los tratamientos de *P. pringlei* fueron homogéneos pero no existen investigaciones para identificar los rangos óptimos de tamaño de bulbo para ser productivos.

Se ha reportado que las geofitas por debajo de un cierto tamaño no florecen, parece que existe un tamaño mínimo de bulbo para cada especie y variedad para florecer, aunque no es el único factor que determina la formación de las flores. En bulbos de tulipán, el bulbo hijo unido al bulbo madre a menudo produce flor, aunque es pequeña y sin valor comercial. Esto indica la posible transferencia al bulbo hijo de alguna hormona de floración que anula las limitación del tamaño adecuado (Rees, 1966).

El tamaño del bulbo es muy importante porque influye en el crecimiento vegetativo, como fue encontrado en jacinto y lirio por Addai y Scott (2011), en la que indicaron que los tamaños de los bulbos utilizados en la siembra se atribuyen a la cantidad de reservas en hidratos de carbono y son transportados a las catáfilas. Los autores

mencionados anteriormente encontraron que bulbos más grandes tienen reservas más altas y por lo tanto las plantas producen mejor calidad de flores con relación a bulbos pequeños. Para la especie *Liatris*, cormos pequeños producen flores de mejor calidad y existe poco efecto del tamaño del bulbo (Halevy, 1990).

Por el contrario en *Brodiaea* (Han *et al.* 1991), citado por Addai y Scott (2011), observaron que el crecimiento vegetativo y la calidad de flor fueron independientes del tamaño del bulbo pero la calidad de la flor si depende del tamaño del meristemo apical. Halevy (1990) indicó que para la especie bulbosa *Triteleia laxa* el tamaño del meristemo apical y no la cantidad de reservas de carbohidratos determinan la habilidad para formar flores. La cantidad de etileno producido no se debió a la cantidad de hidratos de carbono movilizados para la floración, pero si al diámetro del domo del meristemo apical en relación a la tasa de división celular. El porcentaje de brotación en *P. tuberosa* resultó mayor cuando se incrementó el tamaño de bulbo a la siembra relacionando menores días a cosecha en un 25% de los bulbos con diámetro 3 – 4 cm comparados con bulbos con diámetro 1 -2 cm, por lo que se indica que en esta especie si fue significativo el tamaño (Ahmad *et al.*, 2009).

En este estudio no se realizaron análisis de correlación entre el tamaño del bulbo y el tamaño del meristemo apical en ninguna de las especies de *Polianthes*.

8.4. Caracteres florales en *Polianthes tuberosa*

Bulbos sometidos a tratamientos térmicos presentaron diferencias significativas en ciertos caracteres florales. La media de días a cosecha en tratamientos con calor fue de 110.42 dds, mientras que en tratamientos con frío fue de 125.53 dds, para el testigo (T0) fue de 122.41 dds. La floración más tardía se encontró en plantas con tratamiento con ácido giberélico (T9) con una media de siembra a cosecha de 173.5 dds. No se encontró efecto positivo en la dosis de 200 ppm aplicada de este

regulador de crecimiento sobre la floración, los días a cosecha fueron mucho mayores a los de los tratamientos térmicos, por lo que el ácido giberélico no es reemplazante de frío o calor para esta especie de nardo. Como sucede en otras especies como *Lillium*, narcisos, mini callas, donde aplicaciones exógenas de AG_3 favorecen la elongación del tallo e inducción floral sin pasar por semanas de almacenamiento en frío (Khodorova y Boitel-Conti, 2013) (Cuadro 11).

El largo del tallo (p=0.35291), número de flores (p=0.301) no tuvieron diferencias significativas entre tratamientos y tiempo de almacenamiento. En todos los tratamientos el largo de tallo superó la medida comercial por lo que ninguna temperatura afectó a la elongación. El grosor de tallo (p=0.001) tuvo un incremento en el tratamiento con ácido giberélico (T9). Para el largo de la espiga floral (p=0.026) el tratamiento sometido a frío durante 6 semanas (T2) obtuvo los mayores valores.

En los días a floración (p=0.001) presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos de frío, calor, testigo y tratamiento con ácido giberélico, siendo los más precoces los que fueron almacenados en frío durante 7 semanas (T1) y con calor durante 6 semanas (T6), sin embargo la homogeneidad en la curva de cosecha se presentó en el tratamiento de calor T6.

Cuadro 11. Efecto del almacenamiento térmico en las características florales en bulbos de *P. tuberosa*

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Duración (semanas)	Largo de tallo (cm)	Largo de Espiga (cm)		Número de flores	Grosor del tallo (cm)		Días a floración	
0	n/a	0	115.54	28.84	*cd*	32.31	8.86	*bcd*	124.56	*bcd*
1	4	7	113.23	27.49	*d*	29.94	8.01	*d*	100.88	*d*
2	4	6	116.02	35.29	*a*	35.92	9.18	*bc*	119.25	*bcd*
3	4	5	111.09	29.86	*bcd*	31.12	9.51	*b*	141.57	*b*
4	4	4	113.44	30.23	*abcd*	31.03	8.67	*bcd*	128.39	*bc*
5	27	7	117.77	30.79	*abcd*	33.41	8.48	*bcd*	112.33	*cd*
6	27	6	116.59	33.36	*abc*	32.53	8.22	*cd*	104.01	*cd*
7	27	5	111.50	30.32	*abcd*	31.78	8.34	*cd*	115.16	*cd*
8	27	4	117.96	34.40	*ab*	34.62	8.61	*bcd*	109.21	*cd*
9	n/a	0	110.18	30.97	*abcd*	34.58	10.59	*a*	173.46	*a*

Valores promedio con la misma letra son estadísticamente iguales. Medias Duncan α= 0.05
n/a = no aplica

El largo del tallo no se ve afectado por los tratamientos de frío o calor y ácido giberélico (*p*= 0.351), lo que resulta favorable ya que tamaños de bulbos superiores a los 70 cm son potencialmente comerciales y aceptados por el mercado. Al someter a condiciones de almacenamiento térmico previo a la siembra se ve un efecto favorable para *P. tuberosa* ya que no afecta los caracteres florales y ayuda en la inducción floral. Después de la cosecha de las flores, los bulbos deben ser secados por un período de tiempo ya que las reservas de nutrientes se translocan nuevamente de regreso al bulbo. Esto beneficia a los órganos de reserva para la siguiente temporada o para la formación de bulbos hijos. Adicionalmente el romper con el ciclo de las plagas sirve de estrategia en el manejo integrado al impedir el crecimiento y reproducción del picudo (*Scyphophorus acupunctatus*) (Valdés *et al*., 2005), reduciendo costos por labores agronómicas y práctica que permitiría programar las épocas de floración por forzamiento (De Hertogh, 1996).

Se encontraron diferencias estadísticas (*p*=0.026) en la variable largo de espiga floral entre tratamientos resultando un tamaño mayor los tratamientos con calor,

giberélico y en el tratamiento con frío T2, esta condición se observó a pesar que no se encontraron diferencias en el largo del tallo, por lo que estas diferencias significativas en largo de espiga floral se presentaron debido a alargamiento de nudos florales. Estas diferencias se ven influenciadas por el largo de los entrenudos de cada botón mas no por el número de flores (p= 0.301) ya que el número de flores está relacionada por nivel genético la cantidad de flores por tallo Dhua *et al.* (1987) encontraron lo contrario a esta investigación ya que aplicaciones exógenas de giberelinas incrementaron el largo del tallo, espiga floral y el número de flores en nardo en relación a los bulbos control y con otros tratamientos con aplicación exógena de promotores e inhibidores de crecimiento.

El mayor diámetro de tallo fue en los bulbos tratados con ácido giberélico (x=10.59 cm), Esta característica puede deberse al efecto estimulante sobre la división celular y elongación, ya que el efecto de AG_3 es la estimulación de la elongación de los brotes, según estudios realizados con plantas enanas de maíz y guisantes en las cuales existe una relación con la absorción de agua en la célula y la expansión de la pared celular, en donde GAs disminuyen el potencial osmótico celular, lo que aumenta la capacidad de agua dentro de la célula y esto hace posible la expansión. GAs también presentan efectos sobre la arquitectura de la pared celular cambiando el patrón de las microfibrillas de celulosa (Takahashi *et al.*, 1991). En los demás tratamientos se encuentran diferencias mínimas numéricas entre ellos, sin diferencias entre grupos por calor y frío.

La aplicación de ácido giberélico (200 ppm) antes de la siembra a pesar que tiene una ganancia de grosor del tallo retrasó la floración, lo que resulta en una condición desfavorable para *P. tuberosa*. El tratamiento con ácido giberélico resultó en un inicio favoreció la brotación y la promoción de floración pero no fue tan eficaz como la aplicación de alta o baja temperatura previa a la siembra. Nagar (1995) no encontró efecto sobre la ruptura de la dormancia al tratar bulbos con AG_3 en presiembra e indica que los mecanismos que controlan la latencia en nardo aún no se han aclarado. La misma condición que el presente trabajo fue encontrada en

bulbos de tulipán por Xu (2007) en la cual la aplicación de AG_3 extendió la capacidad de brotación y la capacidad de floración por 8 semanas más, sin embargo los días a floración fueron mayores. Para Asil *et al.* (2011), el tratamiento con AG_3 a 100 ppm mejora significativamente la calidad de los brotes de nardo y tiene un efecto positivo en la longevidad de la flor. Aumentando también la altura de las plantas lo que sugiere un aumento en la elongación y engrosamiento celular, adicionalmente para suplir parcialmente el rompimiento de la latencia.

Durante el invierno en climas templados, existen cambios graduales relativos en niveles de las hormonas vegetales, disminuyendo los inhibidores de crecimiento y aumentando las concentraciones de los promotores. En cebolla auxinas, giberelinas y citocininas aumentaron su concentración, sin embargo aplicaciones exógenas de los mismos no estimularon la brotación en los bulbos (Chope *et al*., 2012).

La mayoría de cultivos son producidos fuera del hábitat natural y pueden no estar adaptados a los diferentes climas. Entonces los productores bajo ciertas prácticas agrícolas pueden superar este estado de latencia colocando las plantas en invernaderos, defoliación o tratamiento con productos químicos, en su mayoría con reguladores de crecimiento sintéticos. A pesar de estas prácticas no siempre son exitosos y se puede atribuir a la falta de conocimiento en el control del proceso de la dormancia (Michalczuk, 2008). En *Polianthes tuberosa* Kosugi y Kimura (1961) concluyeron que las altas temperaturas son requeridas para la iniciación floral, diferenciación y desarrollo, las mínimas temperaturas de producción están a los 21 ºC, temperatura en la cual la brotación fue lenta pero la floración se aceleró (Armitage y Laushman, 1990; De Hertogh y Le Nard, 1993). Después de la floración los bulbos de nardo entran aparentemente en un período de dormancia y ya que no puede sobrevivir en el ambiente con temperaturas menores a los 5 ºC y no necesitan bajas temperaturas en ninguna fase del ciclo de crecimiento (Huang *et al*., 1995) siendo primordial no dejar en el suelo los bulbos durante las estaciones frías del año ya que su productividad baja, esta dormancia interna del nardo se rompe a 20 ºC (Dole y Wilkins, 2005).

Sin embargo, existen conflictos para nardo, en dos años diferentes el investigador Post (1952) (citado por De Hertogh y Le Nard, 1993) señaló que las temperaturas para el mejor crecimiento está a los 21 ºC mientras que Post (1959) (citado por De Hertogh y Le Nard, 1993) advierte almacenar a 4.5 ºC; dependiendo de las condiciones de crecimiento posteriores, Rockwell y Grayson (1953) (citado por De Hertogh y Le Nard, 1993) sugieren de 18 – 21 ºC durante el ciclo de vida para la floración del nardo. En estudios realizados en la India (Mukhopadhyay y Sadhu, 1987) proponen almacenar a temperaturas de 30 ºC durante 8 semanas, con la restricción de calidad para el tallo floral.

Almacenar a 10 ºC por 30 d aumenta la productividad sin embargo almacenar a esa temperatura por períodos mayores de tiempo disminuyen la misma (De Hertogh y Le Nard, 1993). Es importante anotar que estos tratamientos solo pueden realizarse cuando el desarrollo apical ha alcanzado una cierta etapa morfológica, de lo contrario puede haber abortos florales, daños o falta de desarrollo de algunos botones (Rees, 1992) los resultados ambiguos posiblemente se vean afectados por otros factores medioambientales y no se puede explicar todavía de manera concreta.

Los tratamientos con almacenamiento a bajas temperaturas parecen no tener efecto sobre la iniciación floral en nardo antes ni después de la siembra según lo reportado por Huang *et al.* (1995). Sin embargo, en este trabajo realizado se encontró que el almacenamiento a bajas temperaturas afectó a la brotación de los bulbos de *P. tuberosa* y alargó la curva de cosecha.

Altas temperaturas de almacenamiento se ha encontrado beneficioso para *Tulipa, Hyacinthus, Narcissus* e *Iris*. Ya que para etapas tempranas de iniciación floral alrededor de los 20 ºC está cerca del óptimo, esto se relaciona con el crecimiento temprano y la rápida iniciación floral (Kamenetsky y Okubo, 2013) en los experimentos realizados en este trabajo además de encontrarse beneficioso los tratamientos a altas temperaturas por su iniciación floral se presentó cambios

morfológicos en los meristemos desde iniciación meristemática, organogénesis y en algunos casos morfogénesis meristemática.

Adicionalmente variaciones de temperatura en almacenamiento resultó beneficioso, en narcisos sometidos a temperaturas de 34 ºC durante 4 semanas antes del almacenamiento a temperaturas de 9 ºC lo que favoreció a una rápida brotación, sin embargo la calidad de la flor fue afectada. Esta dificultad de afectación de calidad de flor fue superada por un interpolado a 17 ºC durante dos semanas entre los 34 ºC y los 9 ºC (Rees, 1966), los bulbos tratados con altas temperaturas constantes presentaron una mejor curva de cosecha, esto se refiere a que la floración fue más corta entre el primer día y el ultimo de cosecha con relación a los demás tratamientos y plantas testigo.

Los tratamientos T1 y T6 son los que presentaron menores días a cosecha, 100.88 y 104.01 dds en promedio respectivamente. Sin embargo los bulbos tratados con calor presentaron la curva de cosecha más homogénea (Duncan=*cd*) con valores entre 104.01 a 115.1 dds en promedio. El tener curvas más cerradas de cosecha es fundamental para prácticas hortícolas ya que con menores ingresos a los campos de cultivo se optimizan los recursos económicos y culturales. En la práctica los productores siempre buscan la manera más rápida de obtener el producto de sus siembras ya que obtendrán más ciclos de cultivo por tiempo determinado, mejor aprovechamiento del suelo, rompimiento del ciclo de las plagas y enfermedades, mayor calidad de las flores y redistribución de las cosechas a lo largo del año (De Hertogh y Le Nard, 1993). Las prácticas de forzamiento y sincronización del cultivo permitirán mejorar las posibilidades de la floración durante el invierno en países tropicales y subtropicales y a pesar del origen tropical de la es necesario el periodo de descanso entre el primer ciclo de producción y las siguientes floraciones planta (Shillo, 1992).

8.5. Giberelinas en *Polianthes tuberosa*

Los niveles de giberelinas en los platos basales de nardo antes y después de los tratamientos térmicos y posteriormente en su crecimiento hasta la floración fueron cuantificados por HPLC-UV.

Las muestras analizadas mostraron cambios de concentración en GAs durante todo su crecimiento, presentando diferencias entre tratamientos y grupos. La presencia de GA_1 solo fue encontrada en los tratamientos T4 a los 0 dds, T6 0 dds, T8 0 dds, T2 0 dds, T4 30 dds, T6 30 dds y T9 30 dds y pretratamiento, con valores entre 4.27 a 5.0 $ng.g^{-1}$. La presencia de la giberelina GA_3 no fue encontrada en los platos basales de nardo.

Posiblemente no fueron identificadas en todas sus fases las giberelinas GA_1 y GA_3 debido a que las concentraciones se encuentran por debajo del límite sensibilidad (<0.5 $mg.g^{-1}$) del HPLC por lo que se centra el estudio en el análisis de las giberelinas: GA_4 y GA_7. Los tiempos de salida, coeficiente de regresión (r^2) y fórmula de regresión se representan en el Cuadro 12, con los cuales se realizaron el análisis de los cambios de nivel a lo largo del tiempo de crecimiento de las plantas.

Cuadro 12. Tiempo de retención y ecuación de la curva HPLC para cada giberelina

Salida No.	Nombre de giberelinas	Tiempo de Retención HPLC (min)	Formula	r^2
1	GA_3	13.31	y = 938.22x - 1239.4	0.9977
2	GA_1	13.85	y = 684.47x - 292.4	0.9966
3	GA_7	18.55	y = 1082.7x - 347.25	0.9970
4	GA_4	19.17	y = 938.22x - 1239.4	0.9994

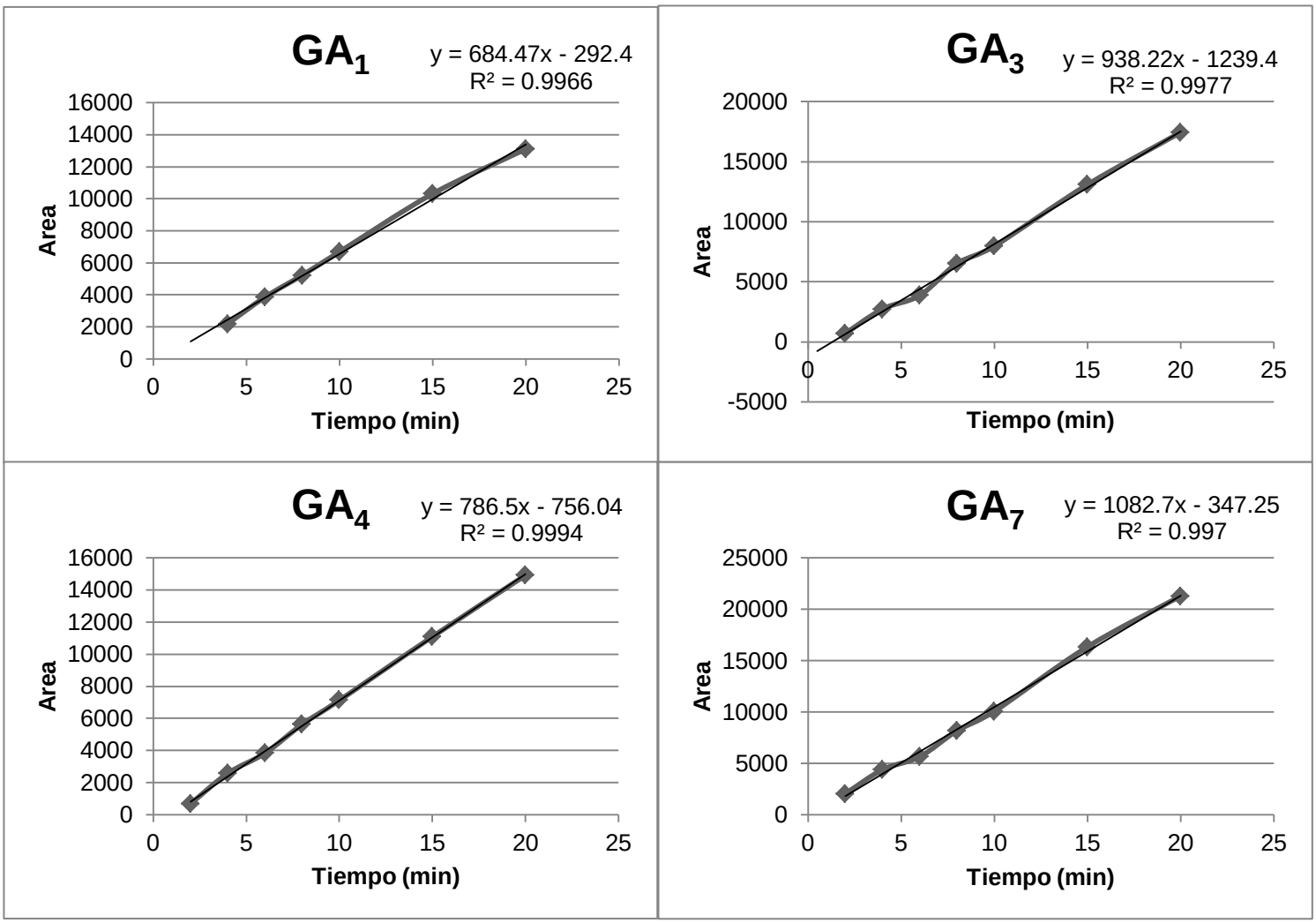

Figura 16. Curvas de calibración para 4 tipos de giberelinas: A1, A3, A4 y A7 en HPLC. Condiciones de fase móvil **A**= Agua acidificada con ácido fosfórico pH= 2.84. **B**= Metanol. Gradiente 10% metanol a 70% en 30 min.

8.5.1. Identificación de GA_4 en *Polianthes tuberosa*

Los niveles de GA_4 en el testigo absoluto desde los 0 dds hasta los 30 dds disminuyeron significativamente y posteriormente también disminuye a los 60 dds. Sin embargo existió un aumento de la cantidad al pasar a los 90 dds. Este comportamiento difiere de los demás tratamientos de frío y calor ya que a los 90 dds presentaron una disminución en concentración de GA_4 en el plato basal (Figura 17), con excepción al T1 que presentó un comportamiento muy similar al T0.

El comportamiento de los niveles de GA_4 para el tratamiento con adición de ácido giberélico, fue significativamente diferente al resto de tratamientos ya que desde los 30 dds hasta los 60 dds, las cantidades en el plato basal de GA_4 aumentó a diferencia de los otros tratamientos que disminuyeron o en ciertos casos se mantuvieron en niveles similares con mínimas variaciones.

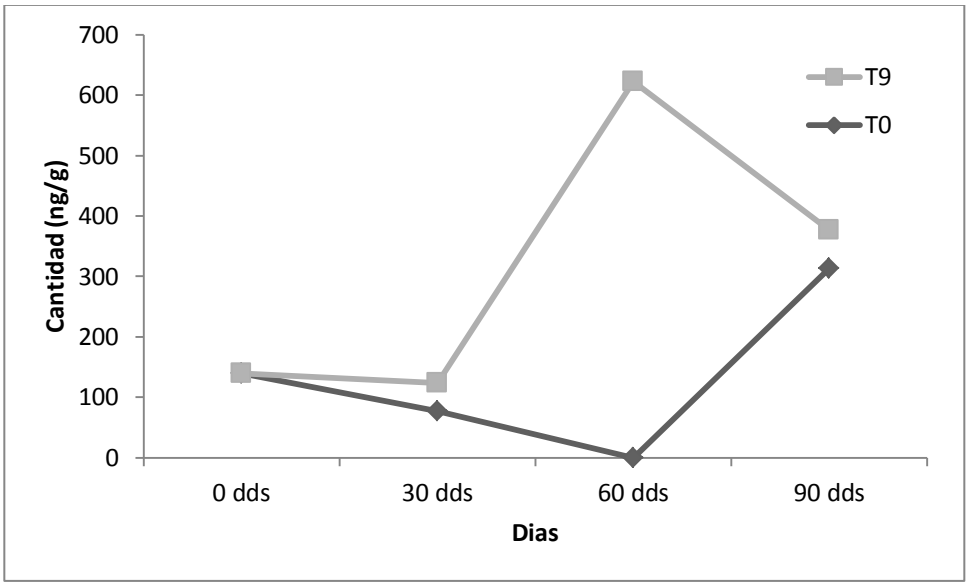

Figura 17. Contenido endógeno de GA_4 en platos basales de *P. tuberosa* en testigo (T0) y tratamiento con ácido giberélico (T9) a lo largo del crecimiento vegetativo.

Los niveles de GA_4 disminuyeron al pasar por tratamiento térmico de frío, con relación al valor inicial. Después de 30 dds los valores de GA_4 disminuyeron en los tratamientos T1, T2, T3 mientras que para el T4 fueron mayores con respecto a los 0 dds (Figura 18) . El comportamiento del grupo de frío fue similar al pasar por 4 ºC durante 4, 5, 6 o 7 semanas de almacenamiento. Desde los 30 dds a los 60 dds los valores de GA_4 aumentan para T2, T3 y T4, sin embargo para el T1 los valores disminuyen de 4.76 a 4.42 $ng.g^{-1}$.

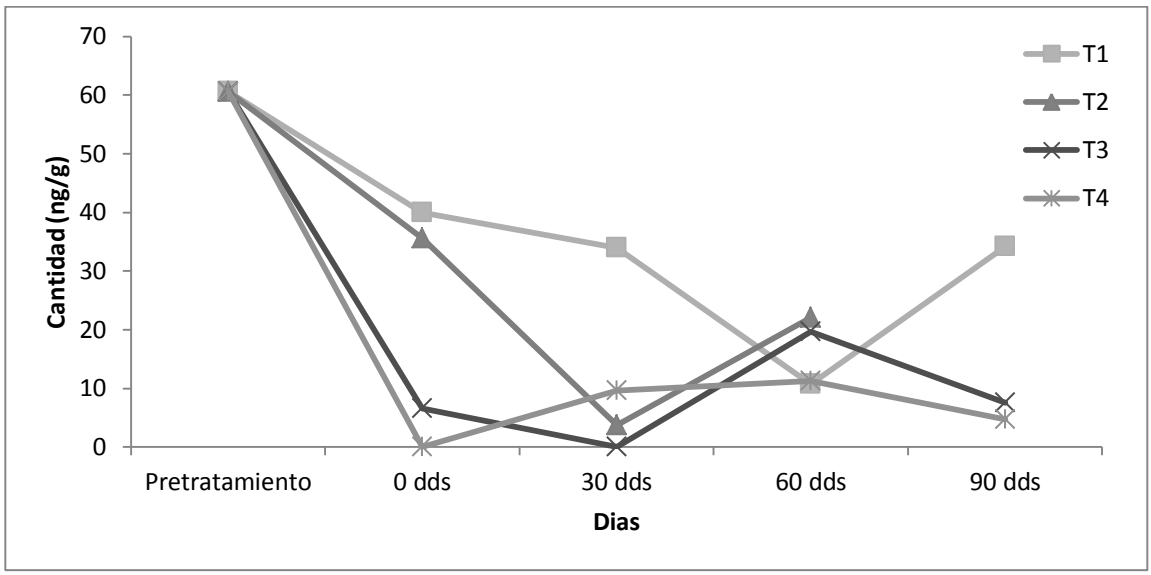

Figura 18. Contenido endógeno de GA_4 en platos basales de *P. tuberosa* en los tratamientos de frío a lo largo del crecimiento vegetativo. T1= 7 semanas. T2= 6 semanas. T3= 5 semanas. T4= 4 semanas.

En tratamientos con almacenamiento con calor a 27 ºC existió también, al igual que frío y testigo, una disminución de GA_4 hasta los 0 dds. A partir de los 0 dds hasta los 30 dds en los tratamientos T5, T6 y T7 una disminución mientras que para el T8 se evidenció un aumento hasta los 30 dds y posterior a ello hasta llegar a los 60 dds. Para los tratamientos T5, T7 desde los 60 dds a los 90 dds existieron aumentos en la concentración de GA_4, T6 fue diferente al resto de tratamientos con calor en este

intervalo de tiempo mostrando una disminución de valores hasta los 90 dds. Al llegar a los 90 dds las concentraciones de GA_4 en todos los tratamientos con calor presentaron cantidades menores con respecto a los 60 dds, comportándose de manera similar entre ellos (Figura 19).

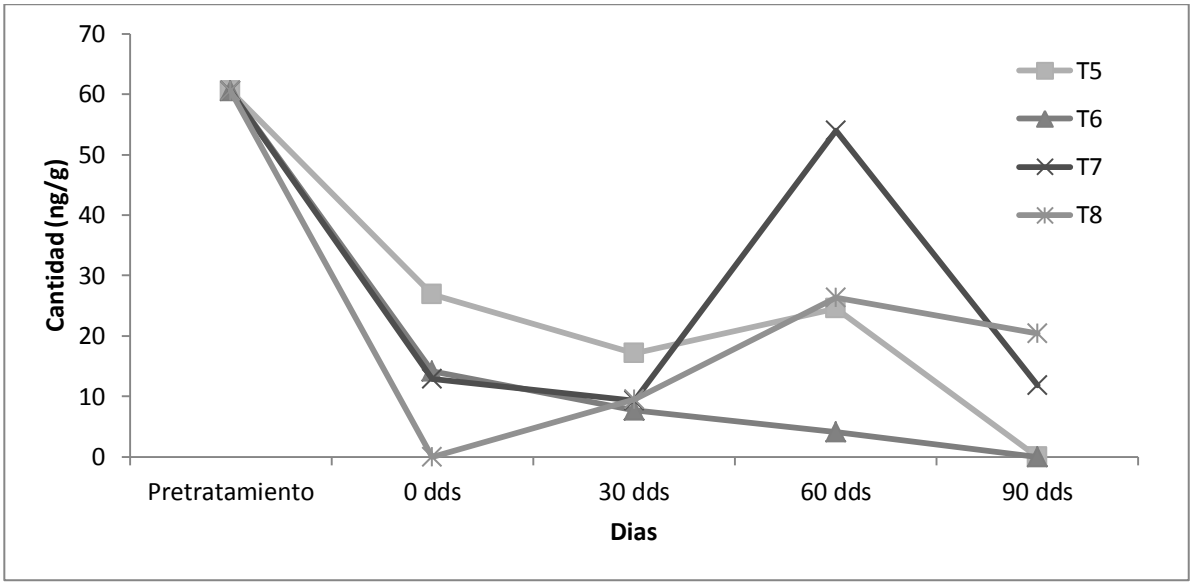

Figura 19. Contenido endógeno de GA_4 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en los tratamientos de calor a lo largo del crecimiento vegetativo. T5= 7 semanas. T6= 6 semanas. T7= 5 semanas. T8= 4 semanas.

8.5.2. Identificación de GA_7 en *Polianthes tuberosa*

GA_7 fue la giberelina con mayores valores encontrados en los platos basales de nardo. Los cambios de nivel de concentración fueron muy similares con respecto a la GA_4. Se evidenció una disminución desde los 0 dds hasta los 60 dds en el testigo (T0) y luego un aumento significativo a los 90 dds. En contraste con T9, tratamiento con ácido giberélico, en la primera etapa de crecimiento tiene una disminución mínima al llegar a los 30 dds para luego elevar significativamente las concentraciones de GA_7 en las muestras de platos basales a los 60 dds y bajar las concentraciones a los 90 dds, en ciertos casos (Figura 20).

Es difícil juzgar el rol de los cambios de giberelinas y su influencia en la actividad que tiene en la planta ya que aún no se han identificado los mecanismos de acción en su totalidad, por lo que al igual que en la identificación de GA_4, el análisis del comportamiento de GA_7 se limitará a la descripción de las concentraciones y su posible intervención en definir los diferentes caracteres florales evaluados (Rebers, 1994).

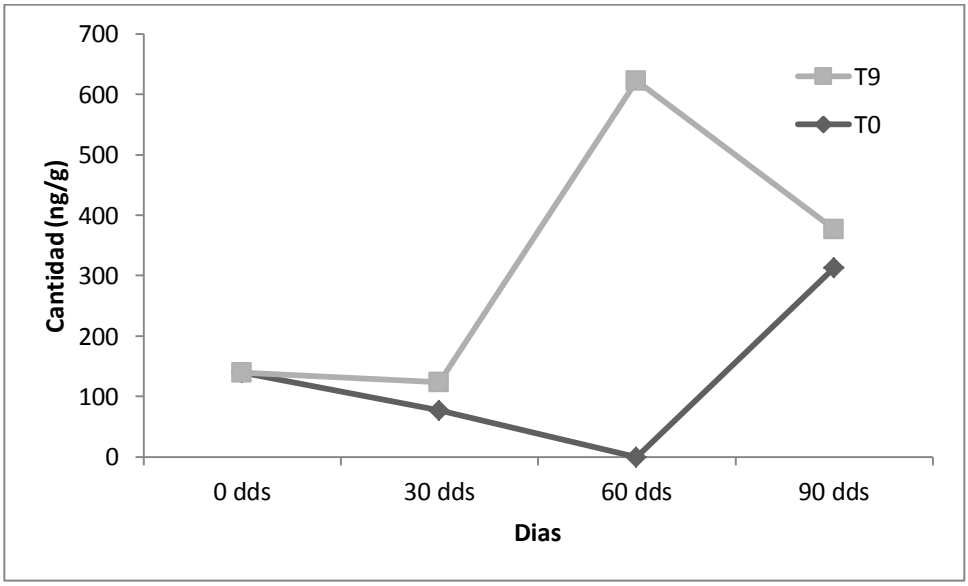

Figura 20. Contenido endógeno de GA_7 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en testigo (T0) y tratamiento con ácido giberélico (T9) a lo largo del crecimiento vegetativo.

Durante la fase de pretratamiento y al pasar por el almacenamiento de frío durante 4, 5, 6 o 7 semanas a temperaturas de 4 ºC, se evidenció una disminución de las cantidades de GA_7 (Figura 21). Esto significa que el almacenar los bulbos de *P. tuberosa* a temperaturas constantes, tiene un efecto en los cambios de nivel de las GA_4 y GA_7. Al llegar a los 30 dds los tratamientos T1, T2 y T3 presentaron una disminución en la cantidad de GAs con respecto a los 0 dds. En contraste el T4 tuvo un incremento en GA_7. Al llegar a los 60 dds, el tratamiento T1 siguió en una disminución de los niveles de concentración mientras que T2, T3 y T4 tuvieron desde un ligero hasta significativo incremento en GA_7.

En la etapa final de crecimiento vegetativo, a los 90 dds el tratamiento T1 tuvo un incremento en las cantidades de GA_7 e igual al comportamiento a los 60 dds, este tratamiento fue diferente con los tratamientos del grupo de calor ya que los tratamientos T2, T3 y T4 disminuyeron en las concentraciones.

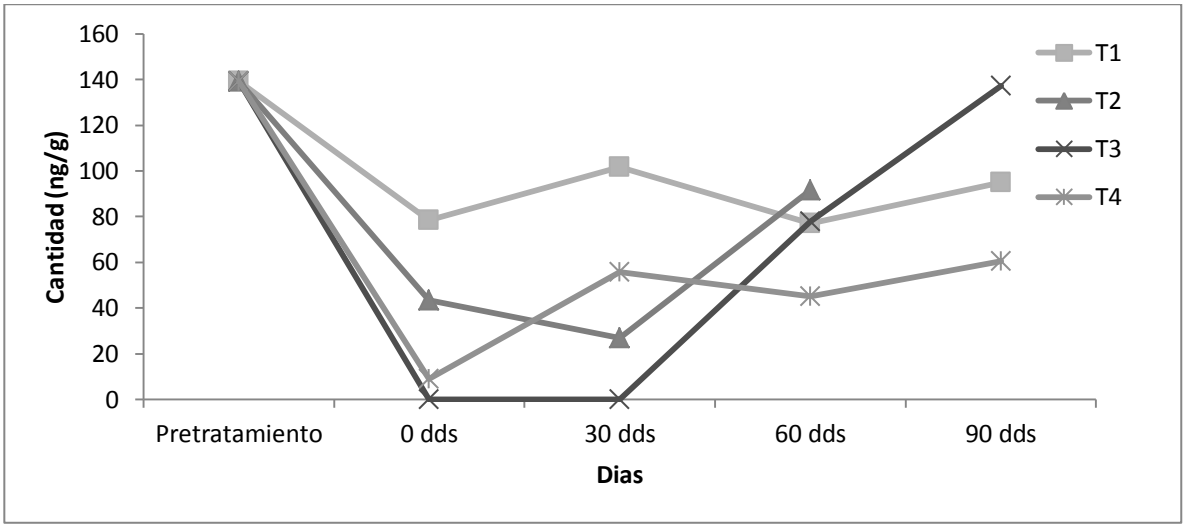

Figura 21. Contenido endógeno de GA_7 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en los tratamientos de frío a lo largo del crecimiento vegetativo. T1= 7 semanas. T2= 6 semanas. T3= 5 semanas. T4= 4 semanas.

El comportamiento en los contenidos de GA_7 fue diferente entre los tratamientos de frío y calor. En los tratamientos de calor se observaron disminuciones en las concentraciones de GA_7. A los 30 dds los tratamientos T5, T6 y T7 presentaron una disminución con respecto a los 0 dds. T8 tuvo un incremento de GA_7 y posteriormente el mismo comportamiento hasta los 60 dds. El T5 también a partir de los 30 dds hasta los 60 dds tuvo un incremento en GA_7, el T6 siguió con la disminución de las concentraciones de esta giberelina, T7 en cambio presenta un aumento a los 60 dds y a los 90 dds una disminución. El comportamiento de T7 es similar al T9 (ácido giberélico) desde los 30 dds hasta los 90 dds. T5 y T6 al llegar a los 90 dds, evidenciaron los valores menores con respecto a las etapas iniciales (Figura 22).

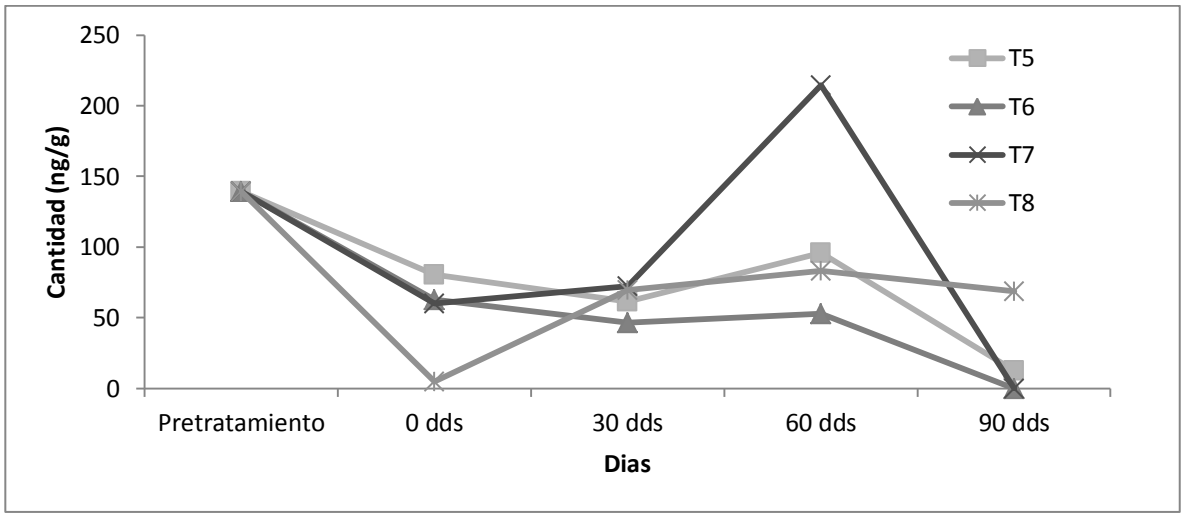

Figura 22. Contenido endógeno de GA_7 en platos basales de *Polianthes tuberosa* en los tratamientos de calor a lo largo del crecimiento vegetativo. T5= 7 semanas. T6= 6 semanas. T7= 5 semanas. T8= 4 semanas.

8.6. Giberelinas en *Polianthes pringlei*

Las muestras de bulbo y planta de la especie silvestre se obtuvieron resultados parciales en la identificación de giberelinas, ya que no fue posible la determinación de GA_3 en las diferentes etapas de crecimiento de la planta. Con excepción de tratamiento de calor y ácido giberélico y testigo a los 60 dds (datos no mostrados). Estos niveles encontrados pueden sugerir que son los niveles más altos en la planta con respecto a las otras etapas vegetativas y debido a la sensibilidad del equipo no fue posible la cuantificación. En ningún caso se pudo determinar las cantidades de ninguna giberelina a los 90 dds, ya que las muestras obtenidas para el análisis tuvieron pesos menores a 16.38 gramos.

8.6.1. Identificación de GA_4 en *Polianthes pringlei*

Existió un aumento de concentración de GA_4 en los bulbos tratados con calor a 27 ºC, en los tratamientos de almacenamiento con frío no se evidenciaron cambios notables en los bulbos (Figura 23). El testigo presentó cambios de nivel en las muestras de planta desde los 0 dds a los 30 dds un incremento significativo para posteriormente caer a los 60 dds en su concentración. Los tratamientos de frío y calor presentaron comportamientos similares en el incremento a partir de los 60 dds, con la diferencia que el tratamiento con calor presentó una mayor cantidad con respecto a los 30 dds. El tratamiento con ácido giberélico T9, también presentó aumentos de concentración al llegar a los 60 dds.

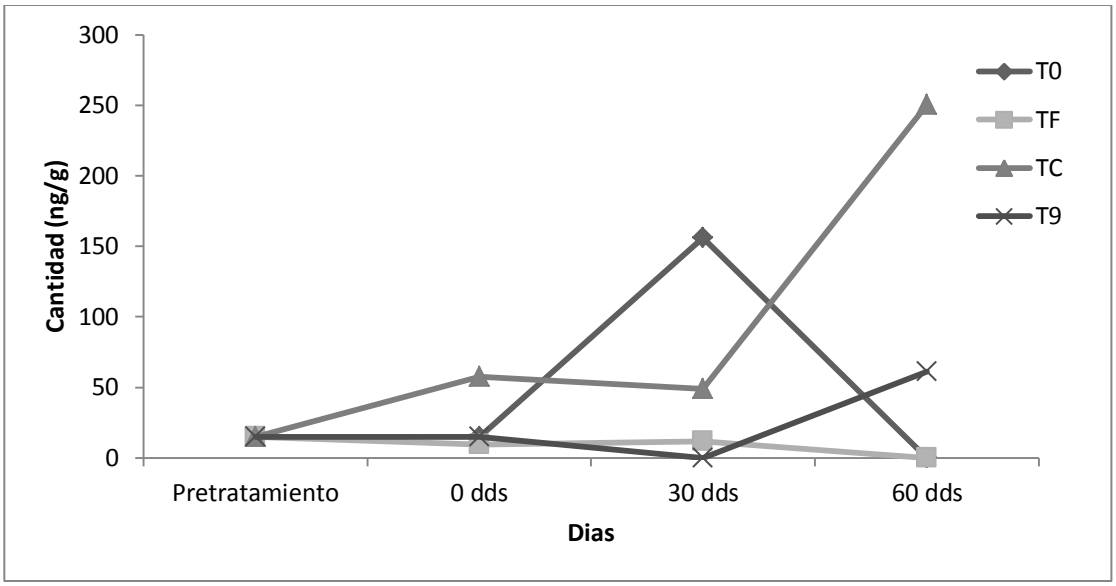

Figura 23. Contenido endógeno de GA_4 en plantas *de Polianthes pringlei* a lo largo del crecimiento vegetativo. T0= testigo. TF= tratamiento con frío durante 6 semanas. TC= tratamiento con calor durante 6 semanas. T9= tratamiento con aplicación de 200 ppm AG_3.

8.6.2. Identificación de GA_7 en *Polianthes pringlei*

El comportamiento de las giberelinas GA_4 y GA_7 fue diferente en *P. pringlei*, ya que al contrario de GA_4, las cantidades en el tratamiento con frío aumentaron al pasar por almacenamiento térmico a 4 ºC y no se presentó diferencias notables en el tratamiento con calor. No fue posible la determinación de GA_7 en el tratamiento con ácido giberélico (T9).

El testigo tuvo un aumento en los contenidos de GA_7 al llegar a los 30 dds y posteriormente una caída a los 60 dds. El tratamiento con calor solo tuvo un efecto en el aumento de GA_7 desde los 30 dds hasta los 60 dds (Figura 24)

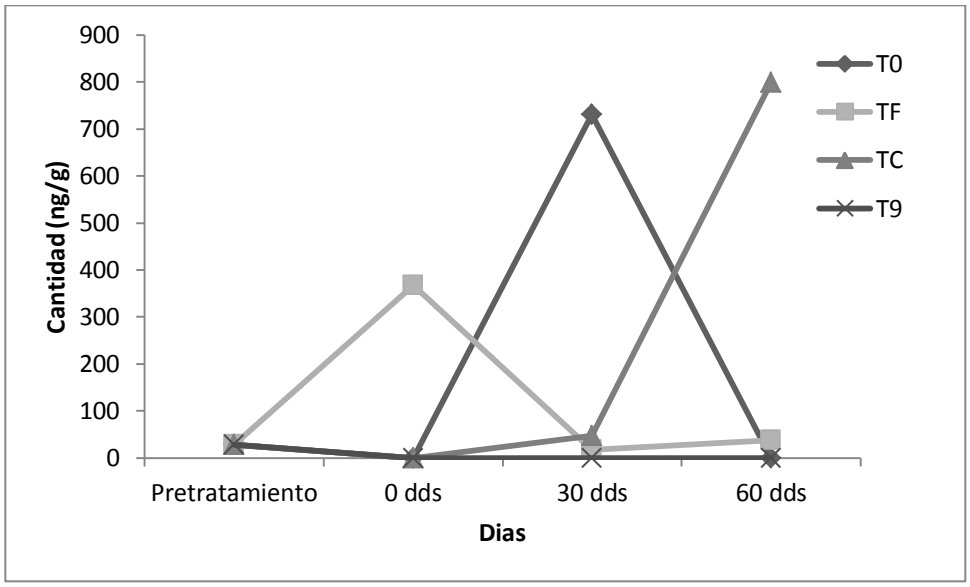

Figura 24. Contenido endógeno de GA_7 en plantas de *Polianthes pringlei* a lo largo del crecimiento vegetativo. T0= testigo. TF= tratamiento con frío durante 6 semanas. TC= tratamiento con calor durante 6 semanas. T9= tratamiento con aplicación de 200 ppm AG_3.

8.7. Efecto combinado de la temperatura y las giberelinas

Tradicionalmente los estudios de las GAs se han centrado en plantas que son de día largo y/o baja temperatura, para favorecer el encendido de la habilidad para la floración en condiciones definidas (Takahashi *et al*., 1991). El rol que juegan las giberelinas en la floración es complicado determinarlo ya que la respuesta de las especies es distinta, en *Arabidopsis* las giberelinas tienen efecto sobre la floración afectando el tiempo a floración y la morfología de la misma, por su naturaleza de planta de día largo (Richards *et al*., 2001). En trabajos realizados en taro (*Colocasia esculenta*) aplicaciones de 0.1 mL de solución de AG_3 (500 a 1000 ppm) no promovió la elongación de los peciolos, sin embargo si tuvo un efecto positivo en la elongación de los cormos; concluyendo que las GAs endógenas juegan algún papel en el crecimiento de órganos. Las giberelinas GA_1 y GA_3, que inducen la floración en plantas de taro y elongación de cormos de manera simultánea, mientras que GA_4 y GA_7 estimulan únicamente la floración; sin llegar a concluir el verdadero modo de acción de las giberelinas en la floración (Takahashi *et* al., 1991). Para el presente trabajo se presentaron estas situaciones:

1. La respuesta de los bulbos a baja temperatura y los niveles encontrados de GA_4 y GA_7 sugieren que son procesos que no están necesariamente acoplados. El comportamiento de los tratamientos de frío tuvieron variaciones en sus niveles de GAs a lo largo del crecimiento, sin embargo los niveles de GA_4 y GA_7 a los 90 dds en el T1 es diferente a T2, T3 y T4 y podría tener una relación directa con los días a floración en los cuales fueron menores a todos los demás tratamientos, muy cercano al T6, estos dos tratamientos tuvieron días a floración de 100.88 y 104.01 respectivamente (Cuadro 11). Los cambios de nivel de GAs desde los 60 dds hasta los 90dds en el T1 aumentaron mientras que para los demás tratamientos de frío disminuyeron; por lo que se puede inferir la participación parcial de GA_4 y GA_7 sobre los días a floración.

2. Adicionalmente el paso por almacenamiento térmico de frío resultó en una disminución de GA_4 y GA_7 de los tratamientos T1 al T4, es difícil aun en el presente trabajo definir concretamente que estos efectos desde el pretratamiento hasta los 0 dds tengan relación con la floración a pesar que se observa en la Figura 17, que el T9 tratado con ácido giberélico no tuvo disminución en ninguna etapa del crecimiento vegetativo en GA_4, es más, entre los 30 dds hasta los 60 dds hubo un gran aumento de las concentraciones de GA_4 y GA_7 en los platos basales de nardo.

3. Los bulbos tratados con temperaturas de calor, también tuvieron comportamiento diferente entre ellos; con la similitud que los 4 tratamientos de calor disminuyeron su nivel endógeno de GA_4 y GA_7 al pasar por el almacenamiento; los niveles del T6 (promedio días a floración 104.01) en GA_4 y GA_7 fueron menores y disminuyeron sus niveles desde los 0 dds hasta los 90 dds a diferencia del T5, T7 y T8, en los cuales desde los 30 dds hasta los 60 dds aumentaron su nivel de concentración endógena en los platos basales, similar al comportamiento para los tratamientos de frío con excepción a T1.

4. Se observó que en todos los casos de los tratamientos térmicos frío o calor y testigos las concentraciones endógenas de GA_4 y GA_7 disminuyeron con relación a los 0 dds y la brotación fue mayor en los tratamientos de frío por lo que se sugiere que estas dos giberelinas no tienen relación en el rompimiento de la latencia de los bulbos en *P. tuberosa*.

Chang *et al.* (2001), encontraron mediante la técnica de GC-MS cambios en niveles de GA_1 y GA_{20}; GA_1 no se detectó en la etapa vegetativa pero si encontraron en los bulbos (cormos llamados en el trabajo) en etapa de iniciación floral y desarrollo

temprana de la flor, lo que parece posible que GA_1 este activo en la iniciación floral de *P. tuberosa*.

Observando estos comportamientos y la relación entre los niveles del T1 y T6 de GA_4 y GA_7 con relación a la precocidad de la floración, se sugiere que las giberelinas encontradas GA_4 y GA_7 endógenamente en los platos basales tienen participación en *P. tuberosa* en la floración bajo condiciones de invernadero y condiciones medioambientales expuestos en este trabajo.

8.8. Comparativo de nivel de giberelinas entre *P. tuberosa* y *P. pringlei* y la relación en la floración y morfología meristemática

Los cambios de concentración de giberelinas encontradas en las dos especies difieren en su comportamiento. La identificación para *P. tuberosa* se lo realizó en todas las etapas del estudio en base a los platos basales, en cambio para *P. pringlei* se hizo basándose al bulbo completo en etapas de pretratamiento y 0 dds, posteriormente se utilizó toda la planta para obtener el peso indicado y ser analizado en el HPLC.

Los niveles de GA_4 y GA_7 (desde pretratamiento a 0 dds), para los tratamientos de *P. tuberosa* presentaron una disminución en las concentraciones en todos los casos; mientras que en el tratamiento de calor de *P. pringlei* los niveles de GA_4 aumentaron al pasar por el almacenamiento térmico, en el caso de tratamiento de frío disminuyeron desde 9.80 a 9.73 $ng.g^{-1}$. Al comparar la disminución de GA_4 y GA_7 en el T6 (6 semanas) conjuntamente con el tratamiento de calor (TC= 6 semanas) en *P. pringlei* entre los 30 dds hasta los 60 dds se puede observar que en el T6 de *P. tuberosa* presentó una disminución en el contenido de GA_4 (Figura 19) y GA7 (Figura 22), mientras que en el otro caso del tratamiento de calor en *P. pringlei* tiene un aumento en las concentraciones (Figura 23). En el caso de los

testigos (T0) entre las dos especies sucede similar a los tratamientos de calor durante 6 semanas de almacenamiento, de manera inversa; lo que significa que para *P. pringlei* los niveles de GA_4 disminuyen en la etapa de 60 dds mientras que para el T6 de *P. tuberosa* los niveles aumentaron de concentración entre los 30 dds a los 60 dds. Por lo que se puede sugerir que existe una posible translocación del plato basal hacia el resto de la planta y es factible realizar estudios destinados a comprobar el transporte de GA_4 en las diferentes etapas de crecimiento de especies del género *Polianthes*.

Existe una correlación de los niveles de GA_7 a los 60 dds con los días a floración para *P. tuberosa* (p =0.010; α=0.05), indicando que los aumentos de nivel de GA_7 retrasan los días a floración; esta relación directamente proporcional indica que las concentraciones a los 60 dds de los tratamientos más precoces (T1 y T6) fue menor en relación a los tratamientos que se demoraron más días a floración, sobretodo el T9. El tratamiento con ácido giberélico donde los niveles de GA_7 desde los 30 dds hasta los 60 dds fueron muy elevados con relación a los otros tratamientos, se puede observar este fenómeno en la Figura 20. La misma relación existe entre el contenido de GA_7 a los 60 dds con el grosor del tallo (p=0.0156; α=0.05) y entre grosor de tallo y días a floración (p=0.0001; α=0.05) en donde los niveles de giberelinas GA_7 tienen influencia directa en el aumento del grosor del tallo en las plantas de *P. tuberosa*.

Los cambios morfológicos encontrados en los meristemos apicales dentro de los bulbos a los 0 dds para *P. tuberosa* (Cuadro 6), sugieren que la inducción floral en esta especie sucede en el interior del bulbo posterior al tratamiento térmico aumentando el diámetro en la base del meristemo para luego entrar en etapa de transición floral a los 30 dds en *P. tuberosa* y hasta los 60 dds en *P. pringlei*, debido a su diferencia en el tiempo de brotación. La formación de primordios florales se produce también en el interior del bulbo luego de la brotación de sus hojas, presentando mayor formación en los tratamientos térmicos de calor a las 6 semanas.

IX. CONCLUSIONES

La diferenciación floral en *P. tuberosa* no ocurre durante el almacenamiento térmico sino que sucede después de la siembra. Existió una brotación más tardía en bulbos almacenados a temperaturas bajas. El efecto de los tratamientos térmicos sobre los bulbos de nardo, tiene efecto en los caracteres florales de grosor, largo de espiga y días a floración. La aplicación de ácido giberélico previo a la siembra y temperaturas de frío retrasaron la floración. La inducción e iniciación floral se desarrolla en el interior del bulbo. La morfogénesis se presenta hasta los 30 dds. Niveles de GA_7 a los 60 dds tienen relación directa con los días a floración en *P. tuberosa*. Mientras que GA_4 y GA_7 están involucrados en el proceso de iniciación floral.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el análisis histológico del meristemo apical en *P. tuberosa* y *P. pringlei* en intervalos menores de tiempo para conocer la diferenciación floral. Realizar evaluaciones en *P. tuberosa* con temperaturas mayores a los 27 ºC para conocer el efecto de almacenamiento en la diferenciación floral. Probar varios niveles de ácido giberélico al momento de la siembra para determinar el efecto de GA_3 en los caracteres florales de *P. tuberosa y P. pringlei*. Realizar identificación de otras hormonas que puedan tener influencia en la floración de plantas del género *Polianthes*. Desarrollar métodos más sensibles que HPLC en la identificación de giberelinas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Addai, I. K. y Scott, P. 2011. Influence of bulb sizes at planting on growth and development of the common hyacinth and the lily. Agriculture and Biology Journal of North America 2(2): 298 – 314.

- Ahmad, I., Ahmad, T., Asif, M., Saleem, M. y Akram, A. 2009. Effect of bulb size on growth, flowering and bulbils production of tuberose. Sarhad Journal of Agriculture 25 (3): 391 – 398.

- Amasino, R.M. 2005. Vernalization and flowering time. Current Opinion in Biotechnology 16: 154-158.

- Amin, R., Faridujjaman, M. y Jamal Uddin, A.F.M. 2012. Phosphorus levels on growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Bangladesh Research Publications Journal. 7 (4): 324-330.

- Armitage, A. Y Laushman, J. 1990. Planting date and in-ground time affect cut flowers of *Liatris, Polianthes, and Iris*. HortScience 25(10): 1239 – 1241.

- Asif, M., Qasim, M. y Mustafa, G. 2001. Effect of planting dates on growth, flowering and corm characteristics of tuberose (*Polianthes tuberosa*) cv. Single. International Journal of Agriculture & Biology. 3(4): 391-393.

- Asil, M. H., Roein, Z. y Abbasi J. 2011. Response of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) to gibberellic acid and benzyladenine. Horticulture, Environment and Biotechnology 52(1): 46-51.

– Bahadoran, M., Salehi, H. y Eshghi, S. 2011. Growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) as affected by adding poultry litter to the culture medium. Spanish Journal of Agricultural Research 9(2): 531-536.

– Barba-González, R., Rodríguez-Domínguez, J.M., Castañedo-Saucedo, M.C., Rodríguez, A., Van Tuyl, J. y Tapia-Campos, E. 2012. Mexican geophytes I. A review of the genus *Polianthes*. Floriculture and Ornamental Biotechnology 6(1): 122-128.

– Boitel-Conti, M. 2013 y Khodorova, N.V.. The role of temperature in the growth and flowering of geophytes. Plants 2: 699-711.

– Cang, Z.S. 2000. Tesis. Changes in cytokinin and gibberellin levels before, during and after floral initiation in *Polianthes tuberosa*. Universidad Nacional Sun Yat-sen. China. 42 pp.

– Chang, Y.P., Ding, S.F., Chou, C.C., Du, B.S. y Chen, W.S. 1998. Daylength affects protein pattern and flowering in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Botanical Bulletin of Academia Sinica 39: 199-203.

– Chang, S.T., Chen, W.S., Koshioka, M., Mander, L.N., Huang, K.L. y Du, B.S. 2001. Gibberellins in relation to flowering in *Polianthes tuberosa*. Physiologia Plantarum 112: 429 – 432.

– Chope, G.A., Cools, K., Hammond, J.P., Thompson, A.J. y Terry, L.A. 2012. Physiological, biochemical and transcriptional analysis of onion bulbs during storage. Annals of Botany. 109: 819-831.

– Chouard, P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. Annual Review of Plant Physiology 11: 191-238.

- De Hertogh, A. 1996. Holland bulb forcer's guide. Ed. Alkemade Printing BV. Quinta Edición. Países Bajos. 455 pp.

- De Hertogh, A. y Le Nard, M. 1993. The physiology of flower bulbs: A comprehensive treatise on the physiology and utilization of ornamental flowering bulbous and tuberous plants. Ed. Elsevier Science Publisher B. V. Países Bajos. 810 pp.

- Dhua, R., Ghosh, S., Mitra, S., Yadav, L. y Bose, T. 1987. Effect of bulb size, temperature treatment of bulbs and chemicals on growth and flower production in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Acta Horticulture 205. New Floral Crops.

- Dole, J. y Wilkins, H. 2005. Floriculture principles and species. Ed. Pearson Prentice Hall. Segunda Edición. Estados Unidos. 1023 pp.

- González, A., Pérez, J.G., Fernández, J. y Barón, S. 1992. Cultivation programming of *Polianthes tuberosa*. Acta Horticulturae 325: 357-364.

- Graebe, J. 1987. Gibberellin biosynthesis and control. Annual Review of Plant Physiology. 38: 419-65.

- Halevy, A. H. 1990. Recent advances in control of flowering and growth habit of geophytes. Acta Horticulturae 266: 35 – 42.

- Hatamzadeh, A., Tehranifar, A. y Akbari, R. 2012. Effect of planting depth, bulb size and their interactions on growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences. 12 (11): 1452-1456.

– Huang, K.L., Miyajim, I. y Okubo, H. 1995. Flowering control of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) in subtropical conditions. Journal – Faculty of Agriculture Kyushu University 39(3.4): 105-113.

– Hurquhart, P. y Hanks, M. 2004. Growing Bulbs: bulbs for every garden style and season. Bay Books. 256 pp.

– Kamenetsky, R. y Rabinowitch, H. D. 2001. Floral development in bolting garlic. Sexual Plant Reproduction 13: 235 – 241.

– Kamenetsky, R. 2005. Production of flower bulbs in regions with warm climates. IX International Symposium on Flower Bulbs. Acta Horticulturae 673: 59-66

– Kamenetsky, R. y Okubo, H. 2013. Ornamental geophytes: from basic science to sustainable sroduction. Ed. CRC Press. 578 pp.

– King, R., Moritz, T., Evans, L., Junttila, O. y Herlt, A. 2001. Long-Day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. American Society of Plant Physiologists 127: 624-632.

– Kosugi, K. y Kimura, Y. 1961. On the flower bud differentiation and flower bud development in *Polianthes tuberosa* L. Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagawa University. 12: 230-234.

– Lee, J.S. y Roh, M.S. 2001. Influence of frozen storage duration and forcing temperature on flowering of oriental hybrid lilies. Hortscience 36(6): 1053 – 1056.

- Levy, Y.Y. y Dean C. 1998. The transition to flowering. The Plant Cell 10: 1973-1989.

- Lobna, S. y Rawia, A. 2011. Simulation effect of some bioregulators on flowering, chemical constituents, essential oil and phytohormones of tuberose (*Polianthes tuberose* L). Journal of America Science 7(5): 165-171.

- López Curto, M. L., Márquez Guzmán, J. y Murguía Sánchez, G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Segunda Edición. UNAM. México. 178 pp.

- Michalczulk, L. 2008. Hormonal control of dormancy. International Journal of Fruit Science 5: 59-73.

- Moftah, A. E. y Al-Humaid, A. I. 2006. Response of vegetative and reproductive parameters of water stressed tuberose plants to Vapor Gard and kaolin Antitranspirants. Journal of Agricultural Science 18(2): 127-139.

- Mukhopadhyay, A. y Sadhu, M. K. 1987. Growth and flowering responses of *Polianthes tuberosa* L. to storage temperature and duration of treatments. Herbertia 43: 30 -32.

- Muriithi, A.N., Wamocho, L.S. y Njoroge, J.B.M. 2011. Distribution, production and quality characteristics of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cut flower in Kenya. African Journal of Horticultural Science 5: 26-35.

- Nagar, P.K. 1995. Changes in abscisic acid, phenols and indoleacetic acid in bulbs of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) during dormancy and sprouting. Scientia Horticulturae 63: 77-82.

– Naidu, S. N. y Reid, M. S. 1989. Postharvest handling of tuberose (*Polianthes tuberosa* L). Acta Horticulturae (ISHS) 261: 313-318.

– Naor, V., Kigel, J., Ben-Tal, Y. y Ziv M. 2008. Variation in endogenous gibberellins, abscisic acid and carbohydrate content during the growth cycle of colored *Zantedeschia* spp. A tuberous geophyte. Journal of Plant Growth Regulation 27: 211-220.

– Nitsch, J. P. 1957. Growth responses of woody plants to photoperiodic stimuli. Proceedings of the American Society for Horticultural Science. 70: 512-525.

– Okamuro, J. K., Den Boer, B. G. W., Lotys-Prass, C., Szeto, W. y Jofuku, K. D. 1996. Flowers into shoots: Photo and hormonal control of a meristem identity switch in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 13831-13836.

– Parimalan, R., Giridhar, P. Joel, A.J. y Jagadeesan, S. 2004. Molecular basis of flower initiation – A review. Indian Journal of Biotechnology 4: 455-465.

– Poursafarali, E., Hashemabadi, D., Kaviani, B. y Kholdi, A. 2011. Effect of different cultivation beds on the vegetative growth of *Polianthes tuberosa* L. African Journal of Agricultural Research 6(19): 4451-4454.

– Rani, P. y Singh, P. 2013. Impact of gibberellic acid pretreatment on growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cv. Prajwal. Journal of Plant Physiology 5:33-41.

– Rebers, M. 1994. Tesis Doctorado en Ciencias Agrícolas y Ambientales. Gibberellins and the cold requirement of tulip. Universidad Wageningen. Países Bajos. 125 pp.

- Rebers, M., Vermeer, E., Knegt, E. y Van Der Plas, L. H. W. 1996. Gibberellin levels are not a suitable indicator for properly cold-treated Tulip bulbs. Hortscience 31(5): 837-838.

- Rees, A. 1966. The physiology of ornamental bulbous plants. The Botanical Review 32(1): 1-20.

- Rees, A. 1992. Ornamental bulbs, corms and tubers. C.A.B. International. Inglaterra. 220 pp.

- Reeves, P. y Coupland, G. 2000. Response of plant development to environment: control of flowering by day length and temperature. Plant Biology 3: 37-42.

- Richards, D.E., King, K.E., Ait-ali, T. y Harberd, N. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 67-88.

- Samuoliene, G. y Duchovskis, P. 2012. Interaction between flowering initiation and photosynthesis, applied photosynthesis. In Tech. Lituania. 21 pp.

- Sass, J. E. 1944. The initiation and development of foliar and floral organs in the tulip. Journal of Colloid Science. 18: 447-456.

- Serrani, J.C. 2008. Tesis: Interacción de giberelinas y auxinas en la fructificación del tomate. Universidad Politécnica del Valencia. España. 152 pp.

- Sheldon, C., Finnegan, E., Rouse, D., Tadege, M., Bagnall, D., Helliwell, C., Peacock, J. y Dennis, E. 2000. The control of flowering by vernalization. Plant Biology 3: 418-422.

- Shillo, R. 1992. The tuber community holds the answer to flowering problems in *Polianthes tuberosa*. Acta horticulturae 325.

- Schmelz, E., Engelberth, J., Alborn, H., O'donnell, P., Sammons, M., Toshima, H. Y Tumlinson Iii, J. 2003. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. Proceedings of the National Academy Sciences 100(18): 10552-10557.

- Sung, S. y Amasino R.M. 2004. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. Current Opinion in Plant Biology. 7: 4-10.

- Taha, R. 2012. Effect of some growth regulators on growth, flowering, bulb productivity and chemical composition of iris plants. Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants 4 (2): 215 -220.

- Taiz, L. y Zeiger E. 2002. Plant physiology. Tercera edición. Ed. Sinauer Associates. Estados Unidos. 690 pp.

- Takahashi, N., Phinney, B.O. y MacMillan, J. 1991. Gibberellins. Springer-Verlag New York Inc. Hong Kong. 443 pp.

- Tawilla, A. S. I. 2000. Tesis. physiological studies in tuberose plant (*Polianthes tuberosa* L.). Facultad de Agricultura. Benha University.

- Trucker, G. A. y Roberts, J. A. 2000. Plant hormone protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press. Estados Unidos. 201 pp.

- Valdés, M.A.E., Aldana, L., Figueroa, R., Gutiérrez, M., Hernandez, M.C. y Chavelas, T. 2005. Trapping of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) with two natural baits in a field of *Polianthes* tuberosa (Liliales: Agavaceae) in the State of Morelos, Mexico. Florida Entomologist 88(3): 338-340.

- Xu, R. Y. 2007. Tesis. Effect of low temperature on changes in endogenous hormone level and plant development in *Lilum* and *Tulipa*. Universidad Niigata. Japon. 118 pp.

- Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. The Annual Review of Plant Biology 59:225-51.

- Watako, A.O. y Ngamau, K. 2013. Effect of subsequent storage of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) bulbs after low temperature pre-treatment improves growth, percent sprouting and cut flower quality. Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology. 15 (1): 5-14.

- Weathers, J. 1911. The bulb book: plants for the open air, store, and greenhouse. Ed. Applewood Books. 502 pp.