



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Papel de la interacción de calcio y boro en el
ennegrecimiento de los pétalos en rosa
(*Rosa* sp.)**

Wilson Bohórquez Santana

**Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá
Facultad de Agronomía – Escuela de Posgrados
Maestría en Ciencias Agrarias – Fisiología de Cultivos
2011**

**Papel de la interacción de calcio y boro en el
ennegrecimiento de los pétalos en rosa
(*Rosa* sp.)**

Wilson Bohórquez Santana

Código 790634

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar el título de Magister
en Ciencias Agrarias – Fisiología de cultivos**

**Director de Tesis
Victor J. Flórez R.**

**Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá
Facultad de Agronomía – Escuela de Posgrados
Maestría en Ciencias Agrarias – Fisiología de Cultivos**

2011

A Dios, por llenarme de entusiasmo y de fortaleza en los diferentes momentos en los cuales me sentí perdido y sin ánimo de seguir adelante; siento que sin Él, la terminación de este trabajo no había sido posible.

A mi madre, mi hija y mis hermanos, porque su existencia y su respaldo me animan a seguir adelante en mi vida.

A mi padre q.e.p.d. ya que me brindo la base económica para hacer realidad esos sueños que de niño trace y que a lo largo de mi vida he alcanzado.

A todos mis maestros de la Universidad Nacional, de los cuales he tenido la fortuna de asimilar no solo conceptos técnicos sino la forma de respetar y colaborar en lo que este a su alcance.

Al Profesor Víctor J. Flórez R. por su valiosa colaboración, sus consejos y asesorías en la dirección de este trabajo.

A todos mis amigos, especialmente Sandro Pérez J. y a Miguel Ángel Sanabria V. por animarme a iniciar este estudio

La preocupación por el hombre y su destino siempre debe ser el interés primordial de todo esfuerzo técnico. Nunca olvides esto entre tus diagramas y ecuaciones.

Albert Einstein

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Facultad de Agronomía, por permitirme hacer parte de esta prestigiosa familia académica.

A Brenntag Colombia S.A, en especial al Ing. Milton R. Galán F. y al Ing. Hugo Bolhuis, por la donación y la asesoría de las soluciones nutritivas indispensables para este ensayo.

Al profesor Raúl I. Cabrera, por sus recomendaciones técnicas

A Rosen Tantau, Ing. Germán Andrés Samper, por la donación del material vegetal de rosa cv. Freedom.

A Ing. Diego E. Nieto C., por su colaboración y asesoría técnica en el manejo y desarrollo de las plantas.

Al Ing. John J. Gómez P., por sus asistencias y enseñanzas en el diseño estadístico.

Al Laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Agronomía, en cabeza de la profesora Dra. Martha C. Henao T.

A la profesora Dra. Martha Cecilia Quicazán y a la estudiante de doctorado Juliana Barrios por su valiosa colaboración en la determinación de parámetros colorimétricos y de antocianinas.

Resumen

Uno de los desordenes fisiológicos más importantes en los cultivares de rosa roja (*Rosa* sp.) corresponde al ennegrecimiento de los pétalos, afectando pétalos externos e internos, lo que resulta en flores de baja calidad. Los síntomas se manifiestan especialmente cuando las flores son cosechadas y almacenadas en condiciones de cuarto frío. El ennegrecimiento de los pétalos se presenta debido a la acumulación exagerada de pigmentos del tipo de las antocianinas, debido posiblemente a condiciones de estrés, como alta o baja radiación UV, bajas temperaturas o a un desbalance de nutrientes en los tejidos afectados. El objetivo de esta investigación consistió en determinar el papel de la interacción del calcio y del boro en el ennegrecimiento de los pétalos. Para ello, plantas de rosa cv. Freedom fueron injertadas sobre los portainjertos 'Natal Briar' y 'Manetti' y cultivadas en cascarilla de arroz quemada al 85%. Los tratamientos consistieron en: 1. solución nutritiva completa; 2. solución nutritiva completa menos calcio; 3. solución nutritiva completa menos boro y, 4. solución nutritiva completa menos calcio y menos boro. Se evaluaron las concentraciones de antocianinas monoméricas y los parámetros colorimétricos en pétalos así como calcio y boro en tejido foliar. Los resultados muestran que la variable antocianinas monoméricas y los parámetros colorimétricos luminosidad (L^*), a^* , b^* , croma (C^*) y tono (h) no se vieron afectados significativamente con los tratamientos aplicados, incluso por la condición de frío a que fueron sometidos los tallos florales. Respecto a la concentración promedio de los iones en estudio, se aprecia que en las plantas crecidas sobre el patrón Natal Briar hay una mayor concentración de boro con respecto a las injertadas sobre el patrón Manetti, siendo las hojas, los órganos de la planta que presentan la mayor concentración de este elemento. También se observa que es en las hojas donde se encuentra la mayor concentración de calcio. Estos resultados confirman que los órganos con baja tasa de transpiración, como las flores, en comparación con las hojas, se caracterizan por tener bajas tasas de translocación de elementos minerales como el calcio y el boro.

Palabras clave: Natal Briar, Manetti, antocianinas, parámetros colorimétricos.

Abstract

One of the most important physiological disorders of red rose (*Rosa* sp.) cultivars is the blackening of petals, affecting outer and inner petals and resulting in production of flowers of poor quality. The symptoms appeared especially when the flowers were harvested and stored in cold room conditions. The blackening of petals occurs due to excessive accumulation of pigments, such as anthocyanins, possibly due to stress conditions, such as high or low UV radiation, low temperatures or a nutrient imbalance in the affected tissues. The objective of this research was to determine the role of the interaction of calcium and boron in the blackening of petals. To this end, rose plants cv. Freedom were grafted into the rootstocks 'Natal Briar' and 'Manetti' and grown in rice hulls burned at 85%. The treatments were; 1) complete nutrient solution, 2) complete nutrient solution without calcium, 3) complete nutrient solution without boron, and 4) complete nutrient solution without calcium and boron. We evaluated the concentrations of monomeric anthocyanins and colorimetric parameters in petals, and calcium and boron in leaves. The results show that the monomeric anthocyanins variable and colorimetric parameters lightness (L^*), a^* , b^* , chroma (C^*) and hue (h) were not significantly affected by the treatments, even at cold condition to which the flowering stems were subjected. With respect to the average concentration of ions in the study, in plants grown on the Natal Briar was observed a higher concentration of boron compared to the ones grafted on Manetti, with leaves being an organ of the plant that had the highest concentration of this element. It was also noted that it is in the leaves where the highest concentration of calcium was founded. These results confirm that organs with low transpiration rates, such as flowers, compared with leaves, were characterized by low rates of translocation of mineral elements, such as calcium and boron.

Keywords: Natal Briar, Manetti, anthocyanins, colorimetric parameters.

Contenido

	Pág.
Introducción	1
1. Objetivos	3
2. Justificación	5
3. Estado del arte	7
3.1 El calcio	7
3.1.1 El calcio y los desordenes fisiológicos	10
3.2 El boro	14
3.3 Pigmentos involucrados en el color rojo de los pétalos	17
3.4 Ennegrecimiento de pétalos	18
3.5 Ennegrecimiento en cultivares en Colombia	20
3.6 Las Antocianinas	21
3.7 Bioquímica de las antocianinas	23
3.8 Relación del pH y de las antocianinas	24
3.9 Los parámetros colorimétricos	25
4. Materiales y métodos	27
4.1 Tratamientos y desarrollo de la investigación	28
4.2 Evaluaciones	29
4.2.1 Determinación de los parámetros colorimétricos	29
4.2.2 Cuantificación de antocianinas monoméricas	30
4.2.3 Análisis del tejido foliar	31

XII Papel de la interacción de calcio y boro en el ennegrecimiento de los pétalos en
rosa (*Rosa sp.*)

4.3 Diseño experimental	31
5. Resultados y discusión	33
5.1 Concentración de Elementos Minerales	33
5.1.1 Concentración promedio de boro en tallos, hojas y botón floral	33
5.1.2 Concentración promedio de boro en hojas	34
5.1.3 Concentración promedio de calcio en tallos, hojas y botón floral	36
5.1.4 Concentración promedio de calcio en botón floral	37
5.1.5 Concentración promedio de calcio en hojas	38
5.1.6 Concentración promedio de calcio en tallos	40
5.2 Determinación de parámetros colorimétricos	41
5.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas	42
5.4 Relación de los parámetros colorimétricos y el contenido de antocianinas monoméricas	44
Conclusiones	47
Anexo A. Análisis estadístico	49
Anexo B. Soluciones nutricionales utilizadas en ensayo	91
Bibliografía	95

Lista de gráficas

Pág.

Gráfico 1. Contenidos promedio de boro en tallos, hojas y botón floral de plantas de rosa cv. Freedom, sometidas a deprivación de calcio y boro.

Gráfico 2. Concentración promedio de boro en hojas de plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre Manetti y Natal Briar.

Gráfico 3. Contenidos promedio de calcio en tallos, hojas y botón floral de plantas de rosa cv. Freedom, sometidas a deprivación de calcio y boro.

Gráfico 4. Concentración promedio de calcio en botones florales de plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre Manetti y Natal Briar.

Gráfico 5. Concentración promedio de calcio en hojas de plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre 'Manetti' y 'Natal Briar'.

Gráfico 6. Concentración promedio de calcio en tallos de plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre 'Manetti' y 'Natal Briar'.

Introducción

Desde 1990, la demanda de flores cortada en los Estados Unidos, el principal destino de las flores de corte Colombianas, ha aumentado considerablemente. Con respecto a las rosas, su demanda ha aumentado incluso mucho más rápido que por crisantemos y claveles. El incremento en las ventas puede ser atribuido en parte a nuevas variedades mejoradas, especialmente con relación a un aumento en la vida en florero. Los consumidores se han vuelto más exigentes en cuanto a este parámetro, y desean que sus rosas no se doblen o mueran en tan solo un día, sino que permanezcan hermosas por una semana o más (Cross, 2000).

El manejo agronómico y los factores ambientales imperantes en la precosecha inciden directamente sobre diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos y pueden afectar seriamente los parámetros de calidad de las flores de corte. Dentro de la primera condición se destacan los aspectos relacionados con la nutrición mineral, balance hídrico y manejo de plagas y enfermedades especialmente. En cuanto a los factores ambientales que afectan la calidad de la flor se destaca la relación entre temperatura, humedad relativa y radiación solar.

Uno de los problemas de poscosecha que disminuye la vida en floreros de las rosas rojas es el ennegrecimiento de los pétalos, el cual consiste en una necrosis de los ápices de los pétalos, que se puede extender a la totalidad de los mismos. A pesar que se han realizado múltiples trabajos que han pretendido explicar las causas exactas del fenómeno, aún no existen conclusiones definitivas. Entre las causas sugeridas se encuentran condiciones ambientales como bajas temperaturas, alta radiación lumínica y por último bajos niveles de calcio y de boro (Cabrera, 2007).

Debido a lo anterior, y soportado en investigaciones realizadas en nutrición mineral, se realizó la presente investigación considerando el balance entre calcio y boro con relación al ennegrecimiento de los pétalos de rosa roja, seleccionando para ello el cv. Freedom. De igual manera, se evaluaron parámetros bioquímicos relacionados con la cantidad de antocianinas, sustancias que posiblemente están implicadas en el fenómeno del

ennegrecimiento de los pétalos. De igual manera, se cuantificaron parámetros colorimétricos de los pétalos de las flores sometidas a tratamientos de privación de calcio y de boro, en condiciones de temperatura ambiente y de cuarto frío.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el papel de la nutrición con calcio y boro sobre el estatus de estos nutrientes en los tejidos (hojas, tallos y botón floral) y su relación con la incidencia del ennegrecimiento de los pétalos en rosa (*Rosa* sp.) cv. Freedom injertada sobre los patrones 'Natal Briar' y 'Manetti'.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar el papel de la interacción de calcio y boro en la incidencia del ennegrecimiento de pétalos en rosa cv. Freedom.
- Cuantificar la concentración de antocianinas totales monoméricas en pétalos de rosa cv. Freedom.
- Realizar la determinación de los parámetros colorimétricos de los pétalos de rosa cv. Freedom
- Determinar la concentración de elementos minerales en los tallos florales de plantas de rosa cv. Freedom.

2. Justificación

La producción de rosas ha aumentado considerablemente en la última década comparado con otras flores de corte, especialmente con la de clavel y crisantemo, debido a su mayor demanda por parte de países como Estados Unidos y los países Europeos. Entre las diferentes cultivares de rosas que son producidas en Colombia, con destino especialmente al mercado de los Estados Unidos, las de color rojo se destacan en importancia, debido al gusto que tienen los consumidores por éstas.

Uno de los problemas de producción y comercialización que presentan algunos cultivares de rosa roja es el ennegrecimiento de los pétalos, fenómeno que disminuye severamente la calidad de la flor. Los síntomas que manifiestan los cultivares afectados, consiste en necrosis de los bordes de los pétalos que puede extenderse a todo el pétalo dependiendo de la susceptibilidad del cultivar al problema. El ennegrecimiento es ocasionado por una acumulación de compuestos fenólicos, en particular pigmentos del tipo antocianinas, debido a diferentes causas aún no determinadas completamente (Franck *et al.*, 2007). En la mayoría de las ocasiones los síntomas aparecen después que la flor es cortada.

A pesar que se han realizado diferentes investigaciones con el propósito de dilucidar las causas del ennegrecimiento de los pétalos, aún no existen aspectos concluyentes sobre el tema. Entre las causas, se han mencionado condiciones ambientales como alta radiación, bajas temperaturas y desbalance nutricional, especialmente el relacionado con una relación inadecuada entre el calcio y el boro (Cabrera *et al.*, 2007), elementos indispensables para el crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, los resultados obtenidos en diferentes investigaciones son contradictorios con respecto al papel de elementos nutritivos en el fenómeno del ennegrecimiento.

Con el propósito de indagar sobre la participación de los portainjertos en el fenómeno del ennegrecimiento, se realizaron evaluaciones en plantas sembradas sobre los portainjertos 'Natal Briar' y 'Manetti', teniendo en cuentas que estos portainjertos difieren

en la absorción y traslocación de algunos elementos minerales y a su utilización en la producción de rosa comercial.

Debido a lo anterior, se realizó una investigación con el objetivo central de determinar el papel del calcio y del boro en el ennegrecimiento de los pétalos rosa roja, utilizando para ello el cv. Freedom, el cual reviste importancia económica en el país y es susceptible al problema.

3.El estado del arte

3.1 El calcio

Después del potasio, el calcio es el elemento básico más abundante en la planta, aunque su contenido en la mayoría de los cultivos es más bajo en relación con el primero. El contenido medio de calcio en las plantas esta en el orden de 1 – 3 kg por 100 kg de masa seca. En cuanto al requerimiento de calcio para *Rose* spp. se encuentra entre 1 – 1.5% (Reuter y Robinson, 1986). Entre todos los órganos, las hojas contienen la mayor concentración. La abundancia de calcio en las hojas puede ser debido a la formación de pectatos de calcio en la lamela media de las células (Rahma y Punga, 2007).

El calcio es relativamente inmóvil en el floema de la planta, lo cual significa que una vez ubicado en un tejido en particular, su movimiento es lento o casi nulo (Epstein, 1973). Esto sugiere que los órganos vegetales con crecimiento activo, tales como los frutos carnosos, bulbos y flores necesitan un suministro constante del elemento.

Su transporte a larga distancia se realiza generalmente a través del xilema. La ruta utilizada para su transporte puede ser por medio de los plasmodesmos (simplasto) o por los espacios intercelulares (apoplasto). En el apoplasto, parte del calcio está firmemente ligado a las estructuras, otra parte es intercambiable en las paredes celulares y en la superficie exterior de la membrana plasmática. En la planta una elevada cantidad de calcio formando complejos con aniones orgánicos como el malato e inorgánicos como el nitrato y el cloruro se encuentran almacenados en las vacuolas, cloroplasto y retículo endoplásmico rugoso, mientras que su concentración en el citoplasma es extremadamente baja (10^{-7} M). Una concentración baja de calcio en el citoplasma es esencial para prevenir la precipitación del P_i , competencia con el magnesio por los sitios de unión y posiblemente como prerrequisito para que funcione como mensajero secundario (Marschner, 1995).

En lo que respecta a su función como mensajero secundario, al percibir la planta un estímulo externo, se presenta una entrada de calcio al citoplasma desde los sitios de almacenamiento, lo cual puede activar varias enzimas, a través de la fosforilación dependiente de proteínas quinasas, las cuales están involucradas en diferentes

reacciones metabólicas que conducen a respuestas en los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal (Poovaiah, 1988).

Las deficiencias de calcio son raras en la naturaleza pero pueden ocurrir en suelos con baja saturación de bases y altos niveles de depósitos ácidos. Debido a que su transporte se realiza preferiblemente por las células muertas del xilema, los síntomas visuales de deficiencia generalmente son observados en los tejidos jóvenes. Las zonas meristemáticas de las raíces, los tallos y las hojas, donde existen divisiones celulares permanentes son las más susceptibles, quizás porque es fundamental para que se forme una nueva lamela media (Taiz y Zeiger, 2006).

La mayoría de las funciones del calcio como componente estructural de las membranas y paredes celulares se debe principalmente a la capacidad que tiene el elemento para realizar complejos estables pero reversibles, con los pectatos de la lamela media, las cuales están conformadas de cadenas de residuos de ácido poligalacturónico con inserciones de ramnosa y, los grupos fosfatos y carboxilatos de las proteínas de dichas estructuras, manteniendo de esta manera la permeabilidad selectiva, la integridad y la compartimentalización celular (Blower *et al.*, 1988; Roux y Slocum, 1982; Rahman y Punja, 2007).

La degradación de los pectatos en los procesos de incidencia de patógenos y los desarrollados en la maduración normal de los frutos son mediados por enzimas conocidas como pectinasas y poligaracturonasas, las cuales incrementan su actividad en los tejidos deficientes en calcio, acelerando la desintegración de las membranas y paredes celulares y el colapso de los tejidos afectados (Rahman y Punja, 2007).

Frecuentemente es observado que los órganos de las plantas que presentan baja transpiración manifiestan desordenes debido a deficiencia de calcio. Las rosas de corte, así como los frutos y tubérculos, se encuentran dentro de esta categoría. El calcio en dichos órganos es conducido dentro de la planta generalmente por el xilema (Marschner, 1995) y, por lo tanto, la baja transpiración podría resultar en menor cantidad del elemento transportado hacia esos órganos. Este fenómeno ha sido propuesto para explicar por qué las rosas crecidas en alta humedad relativa presentan menores concentraciones del elemento y menor vida en florero (Torre *et al.*, 1999).

Una baja concentración de calcio en los tejidos que presentan baja tasa de transpiración como frutos carnosos, flores y tubérculos, es necesaria para permitir rápida expansión

celular y elevada permeabilidad en sus membranas celulares. Sin embargo, se incrementa el riesgo que su contenido en los tejidos caiga por debajo del nivel crítico requerido para la estabilización de la pared celular y la integridad de la membrana y quizá también para que funcione como mensajero secundario (Taiz y Zeiger, 2006).

La deficiencia de calcio, disminuye la vida de poscosecha de las plantas ornamentales y puede también prevenir la apertura normal de las rosas. Debido a esto, soluciones de nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, al 0,1% son aplicadas vía foliar para disminuir el ablandamiento de tallos cortados de algunas variedades (Cross, 2000). Dichas aplicaciones foliares, también han sido utilizados para reducir los síntomas de senescencia en lechuga y manzanos (Singh *et al.*, 2007). Existe considerable evidencia que soporta la idea que el nivel de calcio en los tejidos de la planta puede afectar el proceso de senescencia (Poovaiah *et al.*, 1988).

Al respecto, Rahman y Punja (2007) reportaron un aumento en la vida en florero en rosa al incrementar los niveles de calcio en la solución nutritiva aplicada a las plantas; e indicaron una correlación negativa entre en desarrollo del moho gris producido por *Botrytis cinerea* y la concentración de calcio en la flor.

Además, Cross (2000) encontró que diferentes cultivares de rosa crecidas en dos medios con alto contenido en calcio presentaron mayor vida en florero, comparadas con las crecidas en medios con bajas concentraciones de este elemento. Otro hallazgo importante consistió en observar que las rosas cultivadas con sustratos que contenían cal dolomita-calcítica en proporción 1:1 presentaron mayor vida en florero, que las rosas crecidas en el mismo medio pero con solo cal dolomita; lo que refleja la importancia de las fuentes utilizadas. La misma investigación indicó que la concentración de calcio en los pétalos de las plantas tratadas se mantuvo sin alteración; indicando que el efecto benéfico del tratamiento se debió al incremento del elemento en las hojas de las plantas tratadas (Cross, 2000).

Aunque los cambios fisiológicos y bioquímicos de la senescencia están controlados genéticamente, existe evidencia que supone la participación del calcio en este proceso. Su función estaría ligada al mantenimiento estructural de algunas moléculas de la membrana celular, a través de uniones con moléculas cargadas negativamente como los fosfolípidos y proteínas de membrana, que mantienen la célula funcionalmente (Blower *et al.*, 1988; Roux y Slocum, 1982). Algunos autores han reportado que el calcio retrasa la

descomposición de tales moléculas en el proceso senescente (Itzhaki *et al.*, 1998; Torre *et al.*, 1999).

De igual manera, Borochoy *et al.* (1982) reportaron que en la senescencia de pétalos de rosa se disminuye la fluidez de las membranas celulares, debido a una pérdida de los fosfolípidos y a la disminución en su síntesis. La pérdida en el contenido de estas moléculas resulta en la disminución en la integridad de la membrana.

3.1.1 El calcio y los desordenes fisiológicos

La deficiencia de calcio, especialmente en el tejido meristemático puede reducir la estabilidad de la pared y la membrana celular, conduciendo a la muerte del tejido. Su deficiencia puede ser debida más a un transporte inadecuado por los conductos vasculares de la planta que causada por baja absorción o disponibilidad en el suelo (Cresswell y Weier, 1997).

Es indispensable separar los fenómenos de “deficiencia” y “estrés” de calcio para entender lo relacionado con la dinámica de este elemento en la fisiología de la planta. Una “deficiencia” se logra corregir a través de la adición de una fuente del elemento, mientras que el “estrés” es causado por una localización inadecuada del elemento; en este caso, los síntomas no se expresan en la totalidad de la planta, sino en puntos específicos de crecimiento del tejido (Cresswell y Weier, 1997). La adición de calcio al suelo no siempre corrige el estrés, debido a que la escasez localizada del elemento no es causada por disminución en su absorción y translocación (Shear, 1979).

El estrés abiótico frecuentemente conduce a un incremento del calcio libre (Ca^{+2}) en el citoplasma de las células, lo cual conlleva a la expresión genética que activa respuestas bioquímicas que le permiten a la planta adaptarse a condiciones adversas de diferente naturaleza. De esta manera, el calcio se encuentra involucrado en los mecanismos regulatorios, que le permiten a la planta realizar ajustes bajo condiciones adversas como temperatura alta, daño por frío y estrés hídrico y salino (Liang *et al.*, 2009). Lo anterior ha conducido a relacionar la deficiencias del elemento en los tejidos de la planta con la aparición de desordenes fisiológicos presentados en diferentes cultivos, especialmente en tejidos y órganos que presentan una baja tasa de transpiración como flores, frutos y bulbos (Martyn *et al.*, 2007).

De esta manera diferentes investigaciones han relacionado directamente la deficiencia de calcio en los tejidos con desordenes fisiológicos como la quemazón del ápice en lechuga, pardeamiento en *Telopea* spp y en *Euphorbia pulcherrima* (flor de pascua), pudrición apical en tomate y ennegrecimiento de pétalos de rosa (Collier y Huntington, 1983; Martyn *et al.*, 2003).

Sin embargo, investigaciones realizadas especialmente en tomate y flores de corte, con el fin de aclarar el papel del calcio en éstos desordenes fisiológicos, no han encontrados diferencias significativas en la concentración del elemento en los tejidos y órganos afectados, en comparación con los que no expresaron los síntomas característicos (Murray *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2005).

Al respecto, otros autores al estudiar la relación del calcio con la pudrición apical en tomate, observaron una alta incidencia del desorden pese a encontrar niveles altos de calcio en la parte distal del fruto (Franco *et al.*, 1999). Adicionalmente, Chiu y Bould (1976) no observaron la manifestación del desorden en plantas crecidas con bajo suministro de calcio.

Debido a lo anterior, diferentes autores han cuestionado el papel del calcio como causa primaria y fundamental en estos desordenes y han sugerido que por encima de su concentración en los tejidos, factores ambientales como temperaturas extremas, alta transpiración, viento y alta radiación lumínica pueden estar más comprometidos con la manifestación de los síntomas (Aloni, 1986; Wissemeier, 1993; Saure, 1998; Shaykewich *et al.*, 1971; Franco *et al.*, 1999).

Por ejemplo, al estudiar el ennegrecimiento de brácteas de *Telopea* spp, se encontró que no hubo relación entre las brácteas afectadas por el ennegrecimiento y la concentración de calcio en los tejidos. Por otra parte, las brácteas de las plantas cultivadas bajo sombra muestran menor afectación, que las sometidas a luz plena, lo que demuestra que la radiación lumínica de alguna forma está relacionada con el desorden (Martyn *et al.*, 2007).

Los investigadores sugieren que la radiación lumínica tiene un efecto mayor sobre el ennegrecimiento de las brácteas que el efecto de los tratamientos con diferentes fuentes de calcio. Lo que demuestra que las condiciones ambientales que conducen a la planta a situaciones de estrés, pueden disparar la manifestación de los síntomas característicos (Martyn *et al.*, 2007).

Por otra parte, la incidencia de otro desorden fisiológico conocido como quemazón del ápice, el cual afecta a cultivos como lechuga, coliflor y calabacín se reduce significativamente cuando las plantas se someten a condiciones de baja radiación lumínica (Wissemeier, 1996).

Estos resultados concuerdan con los encontrados en otras investigaciones, en las cuales, desordenes tradicionalmente asociados con baja concentración de calcio en los tejidos como la pudrición apical en tomate y la quemazón del ápice en diferentes vegetales han sido relacionados con condiciones ambientales que conducen al estrés. Dichas condiciones de estrés resultan más críticas cuando los tejidos susceptibles se encuentran en estados de máxima tasa de división y crecimiento celular (Saure, 1998; Saure, 2001; Palzkill *et al.*, 1980).

Por ejemplo, una mayor incidencia en el pardeamiento de las brácteas de *Telopea spp* coincidió con la etapa de máximo desarrollo de sus inflorescencias. El fenómeno generalmente se presenta entre seis a ocho semanas antes de la cosecha, en estadios de desarrollo que coinciden con un rápido desarrollo de la flor y expansión de las brácteas (Martyn *et al.*, 2007).

Por otra parte, entre los parámetros fisiológicos que reflejan un rápido crecimiento de los tejidos vegetales se encuentra una reducción en la concentración de calcio en éstos. De igual manera, éste rápido crecimiento está asociado a un incremento de la actividad de las hormonas del tipo de las giberelinas, las cuales interfieren en la toma y el transporte del calcio en los tejidos de las plantas (Grunzweig *et al.*, 2000).

Mientras que el calcio protege la integridad de las membranas celulares, reduciendo su permeabilidad y previniendo la liberación de iones causados por el estrés (Grattan y Grieve, 1999), las giberelinas tienen el efecto opuesto. Por lo tanto, la susceptibilidad al estrés se incrementa por bajas concentraciones calcio y altos niveles de giberelinas (Fletcher *et al.*, 2000).

De esta forma, las bajas concentraciones de calcio presentes en los tejidos que se encuentran en activo crecimiento puede ser fisiológicamente razonable: tal como lo señaló Marschner (1983), al indicar que en los tejidos en rápido crecimiento, la alta permeabilidad de la membrana es requerida para el flujo de los solutos. Esto significa que una elevada demanda en el suministro de calcio en tejidos en rápido crecimiento de

acuerdo al postulado clásico puede no existir, ya que puede incluso reducir el crecimiento de brotes y frutos y la producción en su totalidad (Hadi *et al.*, 1996).

A pesar de los resultados contradictorios en cuanto al papel de factores externos y endógenos en estos desordenes, es evidente que son promovidos por situaciones de estrés, que resultan más severo cuanto más intenso es el estrés y el cultivar más susceptible (Saure, 1998).

Si la hipótesis es correcta al indicar que en los diferentes desorden fisiológicos vinculados inicialmente con deficiencia de calcio en los tejidos, los síntomas del daño causado por el estrés y la baja tolerancia al estrés resulta en niveles elevados de giberelinas activas, entonces la deficiencia localizada de calcio sería un indicador primario del incremento de la actividad de esta clase de hormonas, más que la causa fundamental del problema. El contenido absoluto de calcio sería significativo cuando es visto en relación al crecimiento. Esto puede explicar la falta de correlación entre la incidencia de ésta clase de desordenes y el contenido de calcio en los tejidos afectados (Saure, 1998).

El papel del calcio aplicado consistiría principalmente en contrarrestar el efecto de las giberelinas sobre las membranas celulares, pero su efectividad para controlar la incidencia del desorden dependería del nivel de estrés: si el crecimiento es vigoroso y no es seguido por estrés severo, no se esperaría mayor incidencia, independientemente de la cantidad del elemento aplicado.

En resumen, atribuir la manifestación de los síntomas de las fisiopatías a factores externos únicos, puede no ser lo ideal. Generalmente, el efecto de factores externos puede ser contradictorio, dependiendo de la intensidad, duración y periodo del crecimiento vegetal cuando se presente. Por ejemplo, factores como alta humedad relativa y suministro alto de nitrógeno tienden a aliviar el estrés y por lo tanto a incrementar su susceptibilidad, pero eventualmente, pueden proteger a las plantas ya afectadas. De igual manera, alta radiación lumínica puede reducir la tolerancia al estrés aumentando el crecimiento pero también aumentando el estrés debido a la mayor transpiración. En lo que respecta a la alta temperatura, puede aumentar la incidencia del desorden, promoviendo el crecimiento y de esta manera reduciendo la tolerancia al estrés, pero puede también producir estrés directamente, incrementando la transpiración,

especialmente cuando hay baja humedad del suelo o incluso afectando la fluidez de las membranas (Saures *et al.*, 1998).

3.2 El boro

A pesar que el boro ha sido reconocido como elemento esencial para las plantas desde el año 1923, sus implicaciones fisiológicas y bioquímicas dentro de los vegetales aún no se encuentran completamente entendidas (Cara *et al.*, 2002). El boro está implicado en las siguientes funciones: síntesis, mantenimiento y estabilidad de la pared celular, metabolismo de: carbohidratos, RNA, auxinas y fenoles; respiración y transporte a través de membrana (Bolaños *et al.*, 2004; Cara *et al.*, 2002). Por lo tanto, su deficiencia, puede causar daños irreversibles a las plantas, cuando estas se encuentran en estados fenológicos críticos (Lehto *et al.*, 2004).

El boro es un micronutriente esencial para las plantas, pero puede ser fitotóxico cuando se presenta en los suelos en alta concentración. Su toxicidad es ampliamente observada y su desbalance disminuye la productividad de los cultivos en amplias zonas del mundo (Ghanati *et al.*, 2005). Los síntomas generales presentes en plantas expuestas a toxicidad por boro incluyen, reducción del vigor, retraso en el desarrollo, síntomas en las hojas (clorosis de los ápices de las hojas viejas, seguida por necrosis no específica y reducción total de la masa seca), disminución en las concentraciones de calcio y de manganeso en hojas (Bolaños *et al.*, 2004) y finalmente disminución en el número, tamaño y peso de los frutos (Bellaloui y Brown, 1998). A nivel celular se puede presentar reducción en: la concentración de clorofila, fijación de CO₂, y por consiguiente en la tasa de fotosíntesis, concentración de prolina, contenido de carbohidratos, tamaño de los cloroplastos, volumen relativo de los tilacoides y cloroplastos (los cloroplastos presentan una coloración oscura y la membrana de los tilacoides se observa alterada; afectando de esta manera el transporte de electrones) e inhibición de la expansión de la pared celular y daño celular en general (Bolaños *et al.*, 2004).

Los requerimientos de boro entre especies se encuentran en un rango de 2 en monocotiledoneas hasta 80 ppm en dicotiledoneas. La cantidad óptima para algunas especies puede ser tóxica o insuficiente para otras (Karabal *et al.*, 2003). Para el caso de *Rosa spp.*, la concentración se encuentra entre 30 y 60 ppm (Reuter y Robinson, 1986).

Las raíces de las plantas absorben boro como ácido bórico no disociado H_3BO_3 y borato los cuales son transportados en las hojas vía xilema. Dentro de las células vegetales, el boro está presente en tres compartimentos: pared celular, citoplasma y vacuola (Pfeffer *et al.*, 2001). La transpiración es un factor clave que afecta la absorción y la concentración de boro en los tejidos, aunque también es móvil por el floema y puede ser retranslocado en cantidades considerables. Por lo tanto, la reducción en el transporte de agua puede reducir la acumulación de niveles tóxicos en los tejidos (Karabal *et al.*, 2003).

Existen dos formas en las cuales el boro se encuentra en las células vegetales: formando complejo con las pectinas y fenoles, y en forma libre (Ruiz *et al.*, 1998). El boro es un elemento esencial para la estructura de la pared celular, debido a la formación de complejos con pectina a través de uniones éster con grupos hidroxilos de carbohidratos o glicoproteínas. Según Blevins y Lukaszewski (1998), en condiciones de deficiencia de boro se interrumpe la síntesis de la pared celular.

El ácido bórico tiene la destacada capacidad de formar complejos con moléculas que contienen grupos dioles y polioles especialmente cis-dioles dentro de su estructura. Dentro de tales compuestos se incluyen diferentes azúcares y sus derivados (azúcares alcoholes y ácidos urónicos), en especial manitol y sorbitol. Estos compuestos funcionan como constituyentes de la fracción de hemicelulosa de las paredes celulares (Blevins y Lukaszewski, 1998). En contraste, azúcares como la glucosa, fructosa, galactosa y sus derivados (sacarosa por ejemplo), no contienen la configuración cis-diol y por lo tanto no forman complejos estables con el borato (Marschner, 1995).

El boro en la pared celular está asociado con la pectina, la cual consiste en tres polisacaridos estructurares: homogalacturona, ramnogalacturona I y ramnogalacturona II, unidas covalentemente; por lo que la variabilidad de los requerimientos de boro entre especies de plantas está relacionado con el contenido de la pectina de la pared celular (Blevins y Lukaszewski, 1998). Recientes estudios indican que la RGII está presente en la pared celular primaria predominantemente como un dímero RGII-B, unido a través de un borato diol-dioéster. La proporción relativa del boro unido a la pared celular varía con la especie, órgano y suministro de boro (Ishii y Matsunaga, 2001).

Las uniones que el borato forma con los componentes de la pared celular son relativamente débiles y por consiguiente apropiadas para permitir el rompimiento y la reconstrucción durante la elongación celular y, adicionalmente, provee cargas negativas

para las interacciones iónicas necesarias para el crecimiento celular. Una de tales interacciones se produce con elementos como el calcio (Marschner, 1995).

Algunas investigaciones sugieren al calcio como estabilizante en los complejos que forma el boro con los componentes estructurales de las células vegetales. En estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, se ha comprobado que el calcio inhibe la descomposición del dímero RGII-B de la pared celular. Por ejemplo, en experimentos conducidos en plantas de tomate, la concentración de calcio asociado a la peptina disminuyó en condiciones de deficiencia de boro (Bolaños *et al.*, 2004). Otros trabajos sobre la estabilidad de diferentes fracciones de boro en raíces intactas sugieren que el calcio puede incrementar la fortaleza de los complejos RGII-B. Además, se han reportado alteraciones en la traslocación de calcio en brotes y frutos en plantas que presentan deficiencia de boro (Apostol y Zwiazek, 2004).

De acuerdo con Corden y Edgington (1960) y Bateman y Lumsden (1965), los pectatos de calcio no se forman en ausencia de boro, y los materiales pépticos que forman parte de la pared celular y la lamela media se tornan más susceptibles a la hidrólisis por parte de enzimas pépticas provenientes de los hongos. Si estos compuestos pépticos están unidos a iones calcio los materiales de la pared celular son relativamente más resistentes a la maceración por enzimas fúngicas. De esta manera, Kobayashi *et al.* (1999) reportó que la formación *in vitro* de complejos RGII -borato fue estimulada por iones calcio, lo que demuestra claramente que la unión del borato con RGII es reforzada por este elemento y esto se refleja en la retención de sustancias pépticas en las paredes celulares de la planta (Stangoulis y Graham, 2007).

Es conocido que la deficiencia de boro, calcio y zinc, causa pérdida en la integridad de la membrana celular, y que la deficiencia mineral está asociada con una alteración rápida del flujo de solutos a través de la membrana. Se presume que la disminución del calcio asociado a la membrana celular en plantas deficientes en boro es ante todo causada por una reducción en el número de cargas negativas proporcionadas por los ésteres de borato y de calcio unidos a los complejos de borato (Muhling *et al.*, 1998).

Por otra parte, la acumulación de fenoles libres es una característica típica de las plantas deficientes en boro y esto probablemente se relaciona con la función que realiza el boro mediante la formación de complejos cis-dioles con determinados azúcares y fenoles. Al presentarse dicha deficiencia, el flujo de sustratos es cambiado hacia el ciclo de las

pentosas fosfato, aumentando de esta manera la biosíntesis de fenoles. La formación de estos complejos está probablemente involucrado en una regulación de fenoles libres (Cara *et al.*, 2002).

Por consiguiente, en deficiencia de boro los fenoles se acumulan en los tejidos y la actividad de la enzima polifenol oxidasa se incrementa, conduciendo a la producción de quinonas en las paredes celulares. Estas moléculas son efectivas en la producción de radicales superóxido, potencialmente eficaces en el daño a las membranas celulares a través de la peroxidación de los lípidos (Marschner, 1995).

De igual manera, radiación lumínica alta conduce a mayores requerimientos de boro. El requerimiento adicional de boro es utilizado para detoxificar o neutralizar las mayores concentraciones de fenoles a través de la formación de los complejos borato – fenol (Marschner, 1995).

Así, se ha propuesto que la pérdida en la integridad de la membrana, causada por niveles deficientes de boro puede ser debido a una acumulación de productos fenólicos y sus productos oxidados, los cuales causan alteraciones en dicha estructura celular (Cara *et al.*, 2002).

En lo que respecta a la función del boro en el metabolismo de carbohidratos, ha sido propuesto que el boro facilita el transporte de azúcares a corta y larga distancia a través de la formación de complejos azúcar-borato en el floema. Sin embargo, tal hipótesis no debe ser aceptada debido a que la sacarosa, el azúcar predominantemente transportado por el floema, forma solamente débiles uniones con el borato. De esta manera, el efecto del boro en el metabolismo de carbohidratos es solamente secundario, excepto sobre sus intermediarios, los cuales influyen la distribución en el flujo de carbono entre los ciclos de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato (Marschner, 1995).

3.3 Pigmentos involucrados en el color rojo de los pétalos

Las antocianinas son los pigmentos más importantes responsables del color rojo de las rosas. Estos pigmentos pueden causar que los pétalos se observen rosados, rojos, violeta o azules, dependiendo de la copigmentación que se presente. La copigmentación es la interacción de antocianinas con flavonoides y otros compuestos como metales, alcaloides, taninos y polisacáridos. La pigmentación de los tejidos vegetales también se afecta por el pH y la temperatura (Jungmin *et al.*, 2008).

Compuestos como las antocianinas y los fenoles son sintetizados con base a información genética y estadio de desarrollo de la planta, e influenciado por factores ambientales como disponibilidad de nutrientes, temperatura y radicación lumínica. La mayoría de los flavonoides protegen a las células de los daños ocasionados por la luz UV y también están involucrados en la defensa de la planta en otras situaciones de estrés, como heridas o ataque de patógenos (Grotewold, 2006).

Cuando algunas flores inician el proceso de senescencia, sus pétalos cambian de color. Éste cambio de color puede disminuir el valor estético de la flor y puede ser utilizado como parámetro de senescencia. La modificación del color puede ser causada por cambios bioquímicos de los pigmentos, por el grado de copigmentación y por cambios en el pH de los pétalos. Entre una de las manifestaciones de estos fenómenos bioquímicos se puede mencionar el ennegrecimiento de los pétalos de la rosa roja, lo cual ocurre debido a la oxidación de flavonas, antocianinas y otros fenoles (Halevy y Mayak, 1979).

3.4 Ennegrecimiento de los pétalos

El desorden fisiológico del ennegrecimiento de pétalos de rosa se manifiesta como áreas negras o cafés hundidas en los ápices de los pétalos, síntomas frecuentemente evidentes después de la cosecha, lo que en ocasiones da lugar a flores severamente afectadas. El ennegrecimiento de los pétalos se puede presentar tanto en los pétalos internos como en los externos (Evans *et al.*, 2005).

La mayoría de los estudios sobre esta fisiopatía la relacionan con múltiples causas, entre las que se destacan factores ambientales, alta o baja radiación UV, baja temperatura (Jones y Clayton – Greene, 1992); baja concentración o desbalance de nutrientes en los tejidos afectados, especialmente en cuanto al calcio y boro. Al respecto, se ha encontrado que una relación alta K:Ca en la solución nutritiva reduce la vida poscosecha de tallos florales de rosa y el valor ornamental en general se afecta, expresado esto en pétalos y hojas cloróticas y necróticas (Torre *et al.*, 2001).

Desordenes similares al ennegrecimiento de los pétalos de rosa se presentan en hortalizas como lechuga, tomate, calabacín, frutas como manzanas y peras, y plantas ornamentales posiblemente debido a una deficiencia de calcio, aunque diferentes investigaciones indican, que las causas fundamentales pueden estar más relacionadas

con factores ambientales como temperatura, humedad e intensidad de luz (Franck *et al.*, 2007; Aloni, 1986; Wissemeier, 1993; Saure, 1998; Shaykewich *et al.*, 1971).

En lo que respecta al papel de la parte nutricional en el desorden, experimentos realizados con el cultivar de rosa roja 'Royalty', cultivada en hidroponía, mostraron que la incidencia de ennegrecimiento de los pétalos fue generalmente mayor en las plantas que se cultivaron en soluciones nutritivas que contenían bajas concentraciones de calcio y boro, y que al aumentar la concentración de éstos elemento en la solución nutritiva, los síntomas disminuyeron (Cabrera *et al.*, 2007).

Sin embargo, sorprendió que los tallos cosechados dos días después del punto comercial de corte no presentaron síntomas de ennegrecimiento de los pétalos, sin importar la solución nutritiva utilizada. Estos resultados sugieren que existe un estado en el desarrollo de la flor en el cual se presenta mayor susceptibilidad en la expresión de este desorden en condiciones que promueven una baja absorción y acumulación de calcio y boro en los tejidos vegetales, especialmente en las hojas y tallos (Cabrera *et al.*, 2007).

Por otra parte, Evans *et al.* (2005) indican que concentraciones de boro en las hojas y pétalos de rosa menores de 10 mg/kg se asocian con mayores incidencias de ennegrecimiento de pétalos, mientras que las concentraciones de calcio en las hojas y los pétalos menores de 1,0% y 0,1% respectivamente, son más susceptibles a desarrollar el desorden.

Lo anterior, confirma que las concentraciones bajas de calcio por sí mismas no son la causa fundamental del problema, excepto en ciertas condiciones, como las presentadas en el proceso de senescencia de la flor y quizá en condiciones de estrés producidas en el proceso de poscosecha de la flor cortada. Es bien conocido en manzanas que las diferencias en susceptibilidad a la deficiencia de calcio después de la cosecha dependen de diferentes factores tales como cultivar, estado de madurez y condiciones de almacenamiento de la frutas ([Ferguson y Drøbak, 1988](#)).

Un desorden fisiológico relacionado con el ennegrecimiento de los pétalos de rosa es el pardeamiento que presentan algunas frutas como pera y manzana, el cual se presenta por oxidaciones enzimáticas de compuestos fenólicos, debido a la acción de polifenol oxidasa (PPO) a quinonas, las cuales son moléculas muy reactivas que forman polímeros de color marrón. Los factores más importantes involucrados en el pardeamiento enzimático son la concentración de fenoles y la actividad de la PPO (Franck *et al.*, 2007).

De esta manera, Hamauzu y Hanakawa (2003) encontraron que las variedades de pera que presentaron menor concentración de compuestos fenólicos fueron menos susceptibles al pardeamiento.

En el metabolismo celular normal de la planta existe producción de ciertas moléculas de RLO (Radicales Libres de Oxígeno) dada por los ciclos respiratorios y generados por el “escape” electrones. Bajo condiciones óptimas, los RLO producidos son eficientemente removidos por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Sin embargo, en condiciones de estrés, la producción de RLO se incrementa considerablemente. Cuando este estado oxidativo es muy intenso o muy largo en el tiempo, se presentan alteraciones en el metabolismo celular, lo que conlleva a la pérdida en la integridad de la membrana celular y por consiguiente en las reacciones de pardeamiento (M’oller, 2001).

Los compuestos fenólicos juegan un papel ambiguo con respecto a los desordenes de pardeamiento: ellos protegen a los tejidos de los RLO, pero los productos coloreados de la oxidación son las causas reales de los síntomas del pardeamiento (Franck *et al.*, 2007).

3.5 Ennegrecimiento en cultivares cultivas en Colombia

Algunos cultivadores de rosas en Colombia indican que el desarrollo de los síntomas del ennegrecimiento de los pétalos se presenta especialmente en días nublados, en donde prevalecen temperaturas relativamente frías y alta humedad relativa. Otros manifiestan que existe un fuerte componente genético involucrado, ya que algunas cultivares son más susceptibles que otras. De igual manera, expresan que condiciones ambientales en donde prevalecen periodos largos con días nublados alternados con días soleados son condiciones que históricamente se han relacionado con el desarrollo de ennegrecimiento de pétalos (Cabrera, 2007).

Los síntomas de ennegrecimiento de los pétalos más evidentes en los cultivares susceptibles se suelen presentar cuando los tallos son cortados y sometidos al tratamiento de frío habitual en la producción comercial de esta clase de flores. Por otra parte, los síntomas suelen ser más pronunciados en plantas menores de 3 años.

De acuerdo con Cabrera (2007), en la cultivos comerciales de rosa de cultivares susceptibles en California EUA, el desorden se manifiesta cuando se presentan temperaturas entre 10 y 15°C por 1 a 2 semanas antes que la flor sea cosechada y el

mantenimiento de la temperatura por encima de 15°C conlleva a la supresión de los síntomas.

De esta manera, temperaturas por debajo de 10 a 12°C en un estadio de desarrollo crítico del botón floral puede afectar positivamente la expresión de los síntomas de ennegrecimiento de los pétalos, debido especialmente a una acumulación exagerada de pigmentos del tipo de las antocianinas (Biran y Halevy, 1974).

3.6 Las antocianinas

Las antocianinas son compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los flavonoides que se encuentran principalmente en frutos, flores y hojas de las plantas; son las responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta a estos órganos (Leguizamón *et al.*, 2005; Leyva, 2009). Su síntesis se produce a partir de la ruta del ácido shiquímico, vía el metabolismo del fenilpropanoide, y se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas y mesofílicas especialmente (Schmitzer *et al.*, 2009).

Las antocianinas se caracterizan por su alto poder reductor y pueden ser inducidas rápidamente en respuesta a condiciones ambientales como alta radiación lumínica, bajas temperaturas, deficiencias de elementos minerales como nitrógeno, fósforo, boro y manganeso (Whittaker *et al.*, 2009) o incidencia de patógenos (Jakopic *et al.*, 2009; Leguizamón, *et al.*, 2005), factores que conllevan a la producción exagerada de especies reactivas de oxígeno. De esta manera, las antocianinas pueden neutralizar los efectos nocivos de los radicales libres que causan daño y muerte celular o disipar energía radiante que no puede ser utilizada en el proceso fotosintético (O' Neill y Gould, 2003).

Al respecto, trabajos realizados en vid confirmaron que alta radiación lumínica incidente en racimos de uva provocaron un incremento de la concentración total de antocianinas monoméricas y flavonoles, pero que estas se redujeron por las excesivas temperaturas absolutas (Steyn *et al.*, 2000). Resultado similar fue reportado por Iglesias *et al.* (1999), en el cual el nivel de antocianinas en la piel de frutas de manzana estaba inversamente relacionada con la temperatura, especialmente con la nocturna.

En la mayoría de las plantas, la síntesis de antocianinas en las flores se encuentra bajo regulación ambiental y su acumulación coincide con el crecimiento de los pétalos (Mol *et al.*, 1996). La activación de la ruta de biosíntesis de antocianinas y su acumulación requiere de una serie de señales ambientales y endógenas. Su acumulación es parte

integral del desarrollo de las flores en la mayoría de las plantas y posiblemente son reguladas por los mismos factores que controlan su crecimiento (Mol *et al.*, 1996; Weiss, 2000).

De esta manera, según Biran y Halevy (1974) y Griesbach (1992) la luz induce la acumulación de antocianinas en tejidos verdes y suspensiones celulares a través de la activación y expresión de los genes responsables de su biosíntesis, y plantas crecidas con baja intensidad lumínica desarrollan flores pálidas con bajo nivel de éstos pigmentos (Biran y Halevy 1974, Griesbach, 1992).

En los tejidos verdes, las antocianinas actúan como pigmentos de protección que absorben la luz UV. La radiación UV-B induce la síntesis de antocianinas en las hojas de varias especies de plantas (Jenkins *et al.*, 1995). Sin embargo, el efecto que tiene la radiación UV sobre la pigmentación de los pétalos y, por lo tanto, en la síntesis de antocianinas depende de la especie vegetal, ya que en algunas es requerida y en otras no tiene ningún efecto (Weiss, 2000).

Por ejemplo, en hojas de diferentes líneas de maíz híbrido, la radiación UV-B (280 a 320 nm) incrementa significativamente el contenido de antocianinas, esto puede ser debido a una respuesta a nivel metabólico al estrés ocasionado por mayores radiaciones UV-B. De esta manera, las líneas sembradas en los lugares con mayor nivel de radiación presentaron contenidos de antocianinas mayores del 45%, comparados con los registrados en los cultivares que crecieron con menor radiación. La mayor concentración de antocianinas es una respuesta que tienen las plantas para resistir los efectos adversos a nivel fisiológico de este tipo de radiación, los cuales pueden causar problemas como mortalidad del polen, asincronía en la floración y esterilidad en plantas de maíz (Pinter *et al.*, 2007).

3.7 Bioquímica de las antocianinas

Las antocianinas se derivan de una rama de la ruta flavonoide (figura N.1).

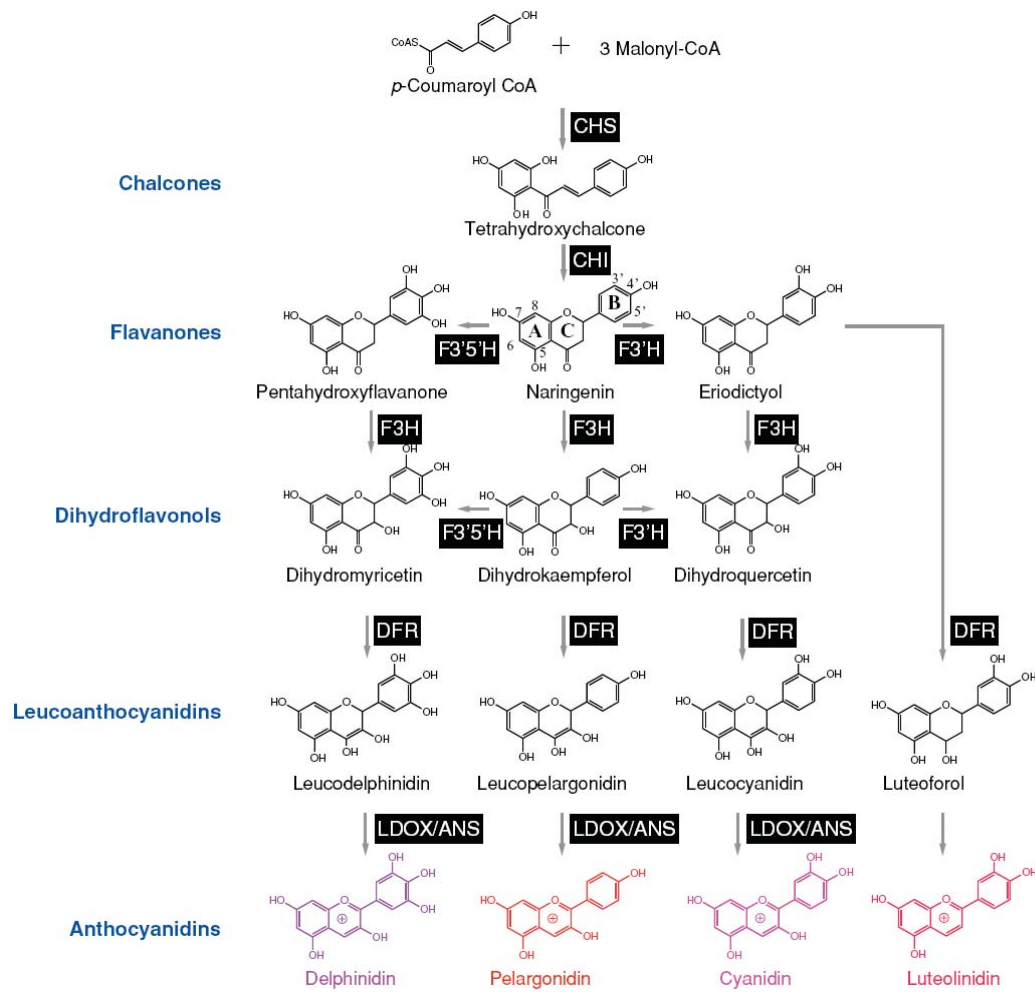


Figura 1. Representación esquemática de la ruta biosintética de las antocianinas más abundantes en la planta (Tomado de Grotewold, 2006).

La estructura de las antocianinas puede variar debido a las sustitución glicosílica que presenten (glucosa, galactosa, rhamnosa, xylosa y arabinosa) en la posiciones 3 y 5 de los anillos A y C. La variación también se puede presentar debido a la acilación de los

grupos de azúcares con ácidos, en especial ácido acético, cumárico, caféico, malónico, felúrico, oxálico y succínico (Grotewold, 2006).

La naturaleza y el número de azúcares ligados a la molécula (glicosilación), la posición de esta unión, la naturaleza y el número de ácidos alifáticos y aromáticos que se unen al azúcar durante la acetilación, juegan un rol importante en el color y en la estabilidad del compuesto. Otros factores de estabilización son la formación de complejos con iones metálicos como aluminio e hierro y la co-pigmentación que es la acetilación con otros flavonoides incoloros (Markovic *et al.*, 2005). Solamente seis antocianinas son comunes en los vegetales superiores: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina (Lee *et al.*, 2008).

Las propiedades antioxidantes de estos pigmentos son moduladas por las diferentes hidroxilaciones y glucosilaciones, y es la cianidina 3-glucosido la antocianina con mayor poder antioxidante (Grotewold, 2006). Sin embargo, las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad está en función de la estructura y la composición de la matriz en que se encuentran. Su estabilidad se ve afectada por el pH, luz, temperatura, clase y concentración de la antocianina y presencia de compuestos como proteínas y elementos minerales (Wrolstad, 2001).

3.8 Relación del pH y las antocianinas

En lo referente a la acción al efecto del pH, estudios previos han encontrado que el color de las flores debido a las antocianinas, puede cambiar en relación al pH celular. Brouillard (1988), citado de Quintana *et al.* (2007), estableció que el pH de la vacuola de la célula puede afectar el color de los pétalos a través de la alteración física entre los electrones del pigmento. Por ejemplo, en *Ipomea tricolor* presenta un color rojo púrpura que cambia a azul cuando la flor se abre, debido a un incremento en el pH.

Por otra parte, en *Hydrangeas*, un incremento en el pH del suelo tiene el efecto opuesto: en pH de 5,5 el color de la flor es azul, pero si el pH incrementa a 6,0, el color de la flor es rosado. En este caso, a pH bajo, el aluminio se vuelve más disponible y es encontrado en altas concentraciones en los pétalos, formando complejo con las antocianinas que resultan en el color azul (Quintana *et al.*, 2007).

Dependiendo del pH en que se encuentran, las antocianinas pueden existir en cuatro formas químicas diferentes: base quinodial, catión flavilio, pseudobase carbino, y

chalcona. En soluciones muy ácidas el catión flavilio rojo es la única estructura. Incrementos de pH dan lugar a la base carbinol incoloro.

Este es el fundamento, del método del pH diferencial propuesto por Giustin y Wrolstad (2001), el cual permite la cuantificación de antocianinas monoméricas totales, incluso en presencia de pigmentos polimerizados y otras sustancias presentes en la muestra. Mientras que los pigmentos de antocianinas poliméricas no muestran un cambio pronunciado reversible del color con los cambios de pH. Esta técnica descrita en materiales y métodos permite determinar la cantidad de antocianinas de una muestra, de forma rápida y económica comparada con los métodos en donde se utiliza HPLC (Lee *et al.*, 2005).

3.9 Los parámetros colorimétricos

Según Wyszecki y Stiles (1982) el color es el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir diferencias entre dos campos de visión del mismo tamaño, forma y estructura, causadas por diferencias en la composición espectral de la energía radiante implicada en la observación. Para los mismos autores, el estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas, que dan al color su carácter tridimensional, así:

- El matiz o tono (hue): atributo fundamental y cualitativo del color. Permite clasificar a los colores como rojizos, amarillentos, etc., o facilita diferenciar un color respecto al gris del mismo brillo, denominado estímulo acromático. Está relacionado con las diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda.
- El brillo o luminosidad característica por la que un color puede clasificarse, en términos generales, como claro u oscuro. Más exactamente se puede definir como el atributo en virtud del cual los colores pueden considerarse equivalentes a alguno de los miembros de la escala de grises, entre el negro y el blanco. Es una medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida.
- La saturación o pureza (*Chroma*), que determina para cada matiz su grado de diferencia frente al gris del mismo brillo, y describe la reflexión o transmisión a una determinada longitud de onda. La saturación es considerada la medida cuantitativa del color.

En la actualidad, todas las teorías y sistemas de color son canalizados por la Comisión Internacional de Iluminación, C.I.E. (*Commission Internationale de l'Eclairage*). El

CIEL*a*b* (CIELAB) es el modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano (Calvo, 1989).

De esta manera el color se determina teniendo en cuenta los valores L^* , a^* y b^* , arrojados por un colorímetro óptico y definido a través de ecuaciones específicas. El parámetro colorimétrico L^* indica brillantez o luminosidad y sus valores van del 0 a 100, en donde 0 = negro y 100 = blanco. El parámetro colorimétrico a^* representa colores rojos cuando el valor es positivo y colores azules cuando el valor es negativo. Mientras que el parámetro colorimétrico b^* representa colores amarillos cuando el valor es positivo y verde cuando es negativo. Estos valores se utilizan para obtener el tono o ángulos de la matiz y pureza o croma del color (Jakopic *et al.*, 2007).

4. Materiales y métodos

El proyecto se realizó en un “invernadero” tradicional del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), Centro de Biotecnología Agropecuaria, ubicado en la Sabana de Bogotá, zona sur, coordenadas geográficas de 74,2° oeste, latitud 4,7° norte. Esta zona corresponde a la cuenca media-alta del río Bogotá, con promedios de temperatura de 13,1°C, humedad relativa de 80,75 %, brillo solar diario de 4,6 h, velocidad del viento de 1,7 m.s⁻¹ y precipitación anual de 1.100 mm.

Se acondicionó un módulo de media nave de invernadero (6,7 x 32 m), donde se dispuso de materas plásticas con capacidad de 8 L, con el sustrato cascarilla de arroz quemada; el cual es de naturaleza orgánica, presenta baja tasa de descomposición, densidad aparente entre 0,090 y 0,22 g de masa seca por cm³, porosidad elevada, pH neutro, conductividad eléctrica (CE) y capacidad de intercambio catiónico (CIC) bajos; es un material rico en potasio y fósforo y pobre en nitrógeno (Calderón y Ceballos, 2003). Estas materas plásticas fueron sostenidas por guayas y estructura en madera, para conformar camas suspendidas.

Como material vegetal se utilizó rosa cv. Freedom injertada sobre *R.* x ‘Natal Briar’ y sobre *R* x Manetti. Una vez establecido el cultivo, de acuerdo con uno de los desarrollos del mismo utilizado en la rosicultura local, se procedió a la aplicación de los tratamientos. En la tabla 1 se muestran las fases fenológicas del cultivo desde la siembra hasta primera cosecha, de acuerdo con una de las propuestas de formación de plantas de rosa.

Tabla 1 Fases fenológicas del cultivo de rosa, de acuerdo con una de las propuestas de formación de plantas de rosa más comúnmente utilizadas localmente.

Fase Fenológica	Periodo Aproximado (días)	Características
0	0	Siembra
I	1 -20	Fijación de raíz
II	21 – 60	Brotación y llenado de follaje
III	61 – 105	Desbrote y basaleo; programación de basales
IV	106 – 150	Formación del segundo piso
V	151 – 195	Desbrote de segundo piso (pinch)
VI	196 – 270	Primera cosecha.

Fuente: Acosta *et al.* (2002), citado por Flórez *et al.* (2002).

4.1 Tratamientos y desarrollo de la investigación

Después de que las plantas estuvieron completamente formadas, es decir, que cada una de ellas hubiese desarrollado 2 tallos basales, recibieron los tratamientos en los últimos 50 días antes del punto de corte comercial. Antes de iniciar con la aplicación de los tratamientos, las plantas recibieron solución nutritiva completa (ver anexo).

Los tratamientos aplicados correspondieron a: 1. solución nutritiva completa (SNC); 2. solución nutritiva menos calcio; 3. solución nutritiva menos boro y, 4. solución nutritiva menos calcio y menos boro (el aporte nutricional de cada una de las soluciones se encuentra en la parte de anexos). Las aplicaciones se realizaron a través de un sistema de fertirriego computarizado, en el cual se programaron 6 pulsos durante el día por 6 días a la semana. Con la finalidad de evitar síntomas severos de deficiencia de calcio y boro que puedan afectar la producción de flores, las plantas recibieron los respectivos tratamientos 15 días después de realizada la poda de producción de los tallos florales. Esto es, en los últimos cincuenta días del pico de floración.

4.2 Evaluaciones

Una vez los tallos florales alcanzaron el estadio de apertura conocido como “punta lápiz”, fueron cosechados en horas de la mañana y sometidos a un tratamiento antifúngico dirigido a los botones florales, con el fin de prevenir la aparición de botritis. Luego, fueron empacados en cajas especiales y transportadas inmediatamente a los Laboratorios de Fisiología de Cultivos de la Facultad de Agronomía Universidad Nacional de Colombia, en donde se hidrataron con agua destilada y fueron clasificados de acuerdo con los tratamientos que conformaron el ensayo.

Los tallos florales pertenecientes a cada uno de los tratamientos fueron divididos en dos grupos: un grupo fue sometido a cuarto frío con una temperatura de 4°C y el otro grupo se sometió a temperatura ambiente, 24°C y fotoperiodo de 16 horas.

Después de transcurridas 24 h, los dos grupos de tallos florales fueron ubicados en un solo recinto con temperatura de 24°C y fotoperiodo de 16 h y alistados para realizar las lecturas de color y la cuantificación de antocianinas totales monoméricas.

4.2.1 Determinación de parámetros colorimétricos

Para las mediciones de color se utilizó un colorímetro portátil marca Minolta[®], el cual fue calibrado con un plato de color blanco antes de iniciar con las lecturas correspondientes. Estas lecturas se hicieron en los pétalos externos de cada uno de los tallos florales pertenecientes a los tratamientos que habían sido sometidos tanto a tratamiento con frío como a temperatura ambiente. Cada una de las lecturas se realizó colocando el sensor del colorímetro en la zona más afectada por el ennegrecimiento de los pétalos externos de los botones florales.

Después de obtener los parámetros colorimétricos del espacio de color CIEL*a*b*, se procedió a calcular el ángulo de matiz (h°) utilizando para ello la ecuación 1. El h° se deriva de las coordenadas de a^* y b^* que es representado en un plano cartesiano de 360°, donde 0°= rojos; 90°= amarillos; 180°= verdes y 360°= azules.

$$\text{Tono } (h^\circ) = \text{Tan}^{-1} (b^*/a^*) \quad (\text{ecuación 1})$$

De la misma manera, se calculó el croma (C*) que indica la intensidad o saturación del color, utilizando la ecuación 2.

$$\text{Croma (C*)} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (\text{ecuación 2})$$

El promedio de tres medidas fue tenido en cuenta para determinar los resultados de cada uno de los componentes colorimétricos.

4.2.2 Cuantificación de antocianinas monoméricas

La cuantificación de las antocianinas monoméricas fue realizada en los pétalos de los botones florales a los cuales se les determinaron los parámetros de color, esto con el fin de analizar si se presenta en los pétalos de ésta variedad de rosa una correlación entre el contenido de antocianinas y uno o más parámetros cromáticos (Schmitzer *et al.*, 2009).

Los pétalos externos de los botones florales pertenecientes a cada uno de los tratamientos fueron retirados manualmente y su masa fresca registrada a través de una balanza analítica. Posteriormente, de acuerdo con la metodología descrita en Jungmin *et al.*, (2008), cada muestra se maceró con nitrógeno líquido utilizando pistilo y un mortero, al cual se le adicionó 6 mL de metanol acidificado con HCl al 1%. Por último, las muestras fueron colocadas en recipientes de vidrio, envueltas en papel aluminio y refrigeradas 24 h.

Posteriormente se determinó el contenido de antocianinas monoméricas utilizando el método del pH diferencial. Para lo cual, se prepararon dos diluciones diferentes de las muestras, una con el buffer de cloruro de potasio (0,025 M), pH 1,0 y otra con el buffer de acetato de sodio (0,4 M), pH 4,5, llevándolas a un volumen final de 20 mL. Se espero 15 minutos a que las diluciones se equilibraran y se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro de cada dilución a 496 nm y 700 nm.

Para calcular la concentración de antocianinas monoméricas se utilizó la siguiente ecuación, expresando la cantidad en términos de cianidina-3-glucosido mg/100g de masa fresca.

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg.100g}^{-1}\text{)} = \text{A.PM.FD.100}/(\epsilon \times 1)$$

Donde: A = Absorbancia, PM = peso molecular de la antocianina (449,2 g.mol⁻¹), FD = factor de dilución (20), ϵ = absortividad molar (26900 g.mol⁻¹.cm⁻¹)

La absorbancia final se obtuvo de la siguiente manera:

$$A = (A_{496} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - A = (A_{496} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

La concentración final de antocianinas (mg/100g) se calculó con base al volumen del extracto utilizado para realizar las diluciones y la masa de la muestra empleada. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.2.3 Análisis del tejido foliar

Los tallos florales fueron separados por órganos (tallos, hojas y botones florales), cuyo tejido fue sometido a secado, molido y análisis del contenido de nutrientes, con énfasis en calcio y de boro. Para la determinación de calcio se utilizó el método espectrofotométrico y para la de boro el de la azometina - H (Cenicafe, 1994). Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Considerando el número de tratamientos (8), las repeticiones (4) y los órganos de las plantas (tallos, hojas y botones florales), se analizaron el contenido nutricional de 96 muestras.

4.3 Diseño experimental

Los datos obtenidos fueron analizados asumiendo una estructura factorial para los tratamientos, con 2 factores (tipo de portainjerto y solución nutritiva aplicada) que resultan en 8 tratamientos. Se realizó la comprobación de supuestos para modelos lineales, encontrando que se satisfacen las condiciones para el uso de los mismos. El diseño experimental usado fue Bloques Completos al Azar y con base en esto se realizaron análisis de varianza para todas las variables evaluadas. Cuando se encontró evidencia de diferencias estadísticamente significativas para los factores en el análisis de varianza, se realizó la prueba de comparación de Tukey HSD.

Para las variables de colorimetría y espectrofotometría se incluyó la condición en que fue realizada la evaluación como un factor adicional al modelo para identificar diferencias

entre las condiciones de frío y ambiente. El análisis de los datos fue realizado usando los procedimientos MEANS, ANAVA, GLM y CORR del programa estadístico SAS 9.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Con el objetivo de conocer si se presenta una correlación entre los parámetros colorimétricos determinados y la concentración de antocianinas monoméricas entre los tratamientos, se efectuó un análisis de correlación utilizando para ello el coeficiente de correlación de Spearman.

5. Resultados y discusión

5.1 Concentración de Elementos Minerales

5.1.1 Concentración promedio de boro en tallos, hojas y botón floral

El gráfico 1 es una representación descriptiva de los contenidos promedio de boro en tallos, hojas y botón floral de las plantas de rosa sometidas a deprivación de elementos minerales e injertadas en los dos portainjertos evaluados.

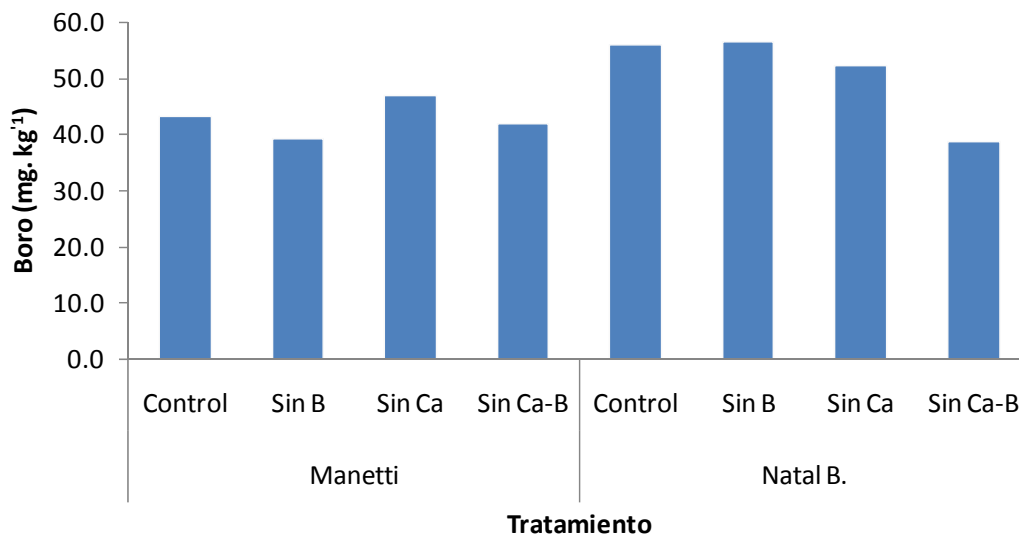


Gráfico 1. Contenidos promedio de boro en tallos, hojas y botón floral de plantas de rosa cv. Freedom, sometidas a deprivación de calcio y boro.

Los resultados (gráfico 1) muestran que los tallos florales del cv. Freedom injertados sobre el portainjerto Natal Briar acumulan mayor concentración de boro respecto a las plantas injertadas sobre el portainjerto Manetti. Esta tendencia se hace estadísticamente significativa cuando se compara la concentración foliar de boro de ambos portainjertos (gráfico 2). Estos resultados son similares a los presentados por Cabrera (2002), en los

cuales las plantas de rosa injertadas sobre 'Natal Briar' presentaron las más altas concentraciones de magnesio, cloro y boro, debido a la mayor capacidad de absorción de estos minerales por parte del portainjerto en mención; adicionalmente confirman las referencias en cuanto a las condiciones nutricionales que tiene dicho patrón, particularmente a la alta sensibilidad al boro (Cabrera, 2002).

Los resultados también indican que los tallos florales injertados sobre 'Natal Briar', bajo una solución nutritiva desprovista de calcio y de boro acumularon en sus tejidos la menor concentración de boro, en comparación con los tallos que se desarrollaron en las plantas cultivadas en ausencia de éste elemento exclusivamente. Sin embargo, esta tendencia no se presenta en las plantas injertadas sobre 'Manetti'.

De igual manera Carpena *et al.* (2005) indican que plantas de arveja (*Pisum sativum*) sometidas a privación de calcio y de boro presentaron en sus tejidos las menores concentraciones de boro. De acuerdo a estos resultados, se observó una influencia directa entre el suministro de calcio y la movilidad de boro en las plantas.

Existen al respecto diferentes investigaciones que demuestran el sinergismo que existe entre el calcio y el boro en la planta. Por ejemplo, se ha demostrado que el calcio inhibe la descomposición del dímero RGII-B de la pared celular y estabiliza las diferentes fracciones en las cuales se encuentra el boro en diferentes estructuras celulares (Bolaños *et al.*, 2004; Apostol y Zwiazek, 2004; Stangoulis y Graham, 2007).

5.1.2 Concentración promedio de boro en hojas

El gráfico 2 muestra que la concentración de boro en las hojas es estadísticamente significativa con relación al portainjerto utilizado. Siendo las hojas de las plantas crecidas sobre el portainjerto 'Natal Briar', las que presentan la mayor concentración del elemento.

Igual tendencia fue encontrada por Carpena *et al.* (2005), en la cual la mayor concentración de boro en plantas de arveja (*Pisum sativum*) se presentó en las hojas.

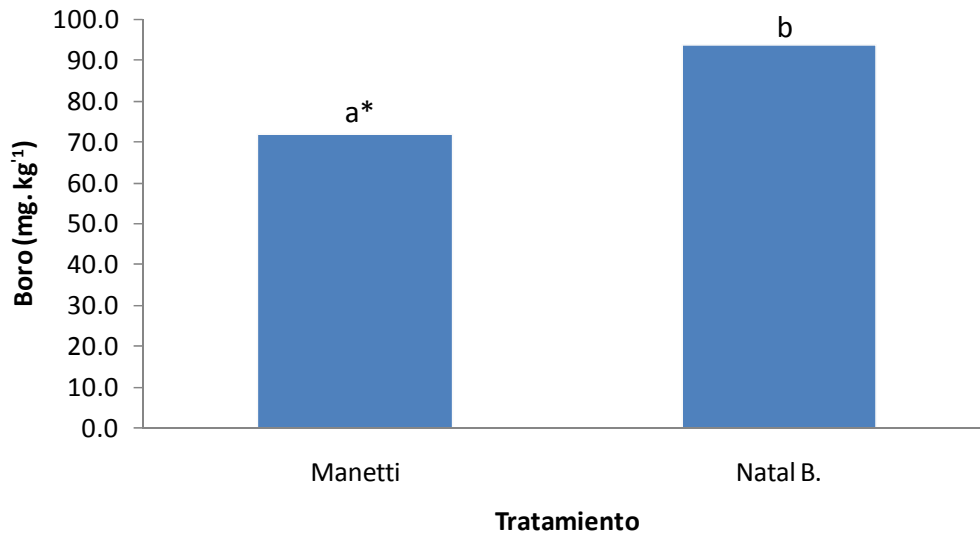


Gráfico 2. Concentración promedio de boro en hojas de plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre Manetti y Natal Briar

*Promedios seguidos de la misma letra no presentan evidencia de diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey HSD con una confianza del 95%.

En gráfico 2 muestra que en las hojas de las plantas injertadas sobre 'Natal briar' acumulan mayor concentración boro, comparado con las injertadas sobre 'Manetti'. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tallos, hojas y botón floral.

Resultados similares fueron encontrados por Papadakis *et al.* (2004), en los cuales plantas de mandarina (*Citrus nobilis*) injertadas sobre 'Sour orange' acumularon mayor concentración de boro, en comparación con las injertadas sobre 'Swingle citrumelo', siendo las hojas los órganos de la planta donde se acumula la mayor concentración de este elemento. Adicionalmente, los autores indican que el boro en esta especie vegetal es inmóvil en el floema y por consiguiente, no puede ser distribuido dentro de la planta.

Así mismo, López-Gómez *et al.* (2007), indica que plantas de *Eriobotrya japonica* Lindl. presentan diferencias significativa en cuanto a la concentración de boro en las hojas, dependiendo del portainjerto utilizado.

Guta (2007) menciona que las mayores concentraciones de boro en especies como: Alfalfa (*Medicago sativa* L.), brocoli (*Brassica oleracea* L.), coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) se presentan en las hojas, en comparación con los tallos.

Por otra parte, siendo las hojas los órganos más importantes en la fotosíntesis de la planta, estas constituyen los tejidos vegetales que mayormente responden a cambios internos y externos en el suministro de nutrientes (Cabrera, 2006).

Además, se ha encontrado, que en plantas de cítricos, las hojas son los sitios en donde se presenta la mayor acumulación de boro, siendo las hojas jóvenes las que acumulan la mayor concentración. Lo que indica que en condiciones de plantas sometidas a una deficiencia de boro, éste se transporta desde las hojas viejas hacia las jóvenes (Sheng *et al.*, 2009), a pesar de que este elemento es considerado poco móvil en el floema (Marschner, 1995).

5.1.3 Concentración promedio de calcio en tallos, hojas y botón floral

El gráfico 3 es una representación descriptiva de los contenidos promedios de calcio, en tallos, hojas y botón floral de plantas de rosa sometidas a deprivación mineral e injertadas en los dos portainjertos.

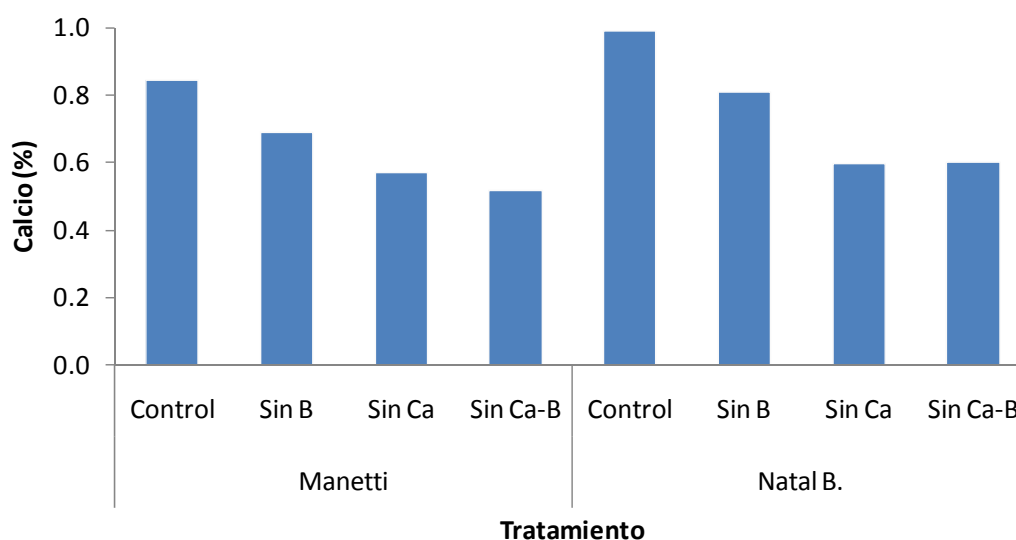


Gráfico 3. Contenidos promedio de calcio en tallos, hojas y botón floral de plantas de rosa cv. Freedom, sometidas a deprivación de calcio y boro.

En cuanto a la concentración de calcio y de acuerdo con el análisis global de tallos florales completos, no se observan diferencias estadísticas significativas en cuanto a los patrones utilizados. Estos resultados también concuerdan nuevamente con los encontrados por Cabrera (2002), en los cuales, la concentración de éste elemento no se

vio afectada por los portainjertos utilizados para el crecimiento del cultivar de rosa 'Royalty'.

En el gráfico 3 se observa que los tratamientos en los cuales las plantas estuvieron sometidas a soluciones nutritivas desprovistas de calcio y de boro presentaron las menores concentraciones de calcio, de forma independiente al portainjerto utilizado; lo cual constituye una evidencia adicional sobre el sinergismo que tienen estos dos elementos en la fisiología de la planta.

Esto puede ser debido a que las funciones del calcio como componente estructural de las membranas y en especial de las paredes celulares las realiza en asociación con los iones borato presentes en los tejidos (Blower *et al.*, 1988; Roux y Slocum, 1982; Rahman y Punja, 2007).

El calcio junto con el boro son elementos clave para la estabilidad y el mantenimiento de la estructura de las membranas y paredes celulares primarias, ya que unen diferentes tipos de moléculas fundamentales para los procesos de crecimiento y desarrollo (Pilbeam y Morley, 2007).

5.1.4. Concentración promedio de calcio en botón floral

El gráfico 4 muestra que la concentración de calcio en el botón floral es estadísticamente significativo con relación al portainjerto utilizado. Siendo los botones de las plantas injertadas sobre 'Natal Briar' los que presentan la mayor concentración del elemento.

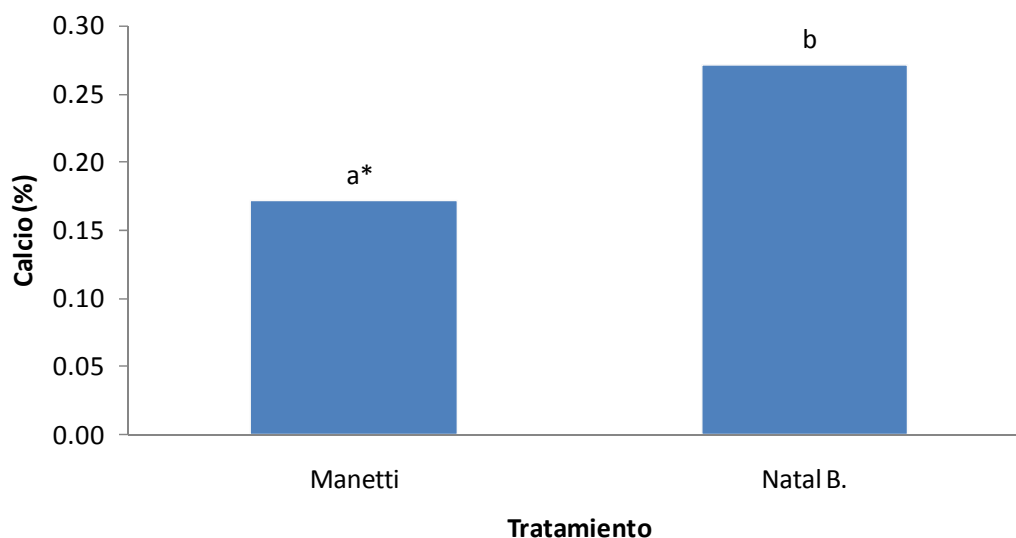


Gráfico 4. Concentración promedio de calcio en botones florales de plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre Manetti y Natal Briar.

*Promedios seguidos de la misma letra no presentan evidencia de diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey HSD con una confianza del 95%.

Respecto a las concentraciones de calcio en los botones florales, se aprecia que la concentración del elemento en los tallos florales injertados sobre 'Natal Briar' es significativamente mayor que la de los injertados sobre 'Manetti'.

Estos resultados son contrarios a los encontrados por Cabrera (2002), en los cuales la concentración del elemento analizado no se afectó por el portainjerto utilizado; posiblemente debido al cv. de rosa utilizado.

5.1.5 Concentración promedio de calcio en hojas

El gráfico 5 presenta la concentración promedio de calcio en las hojas de las plantas de rosa, indicando claramente que existen diferencias significativas en la concentración de dicho elemento en relación con los tratamientos evaluados.

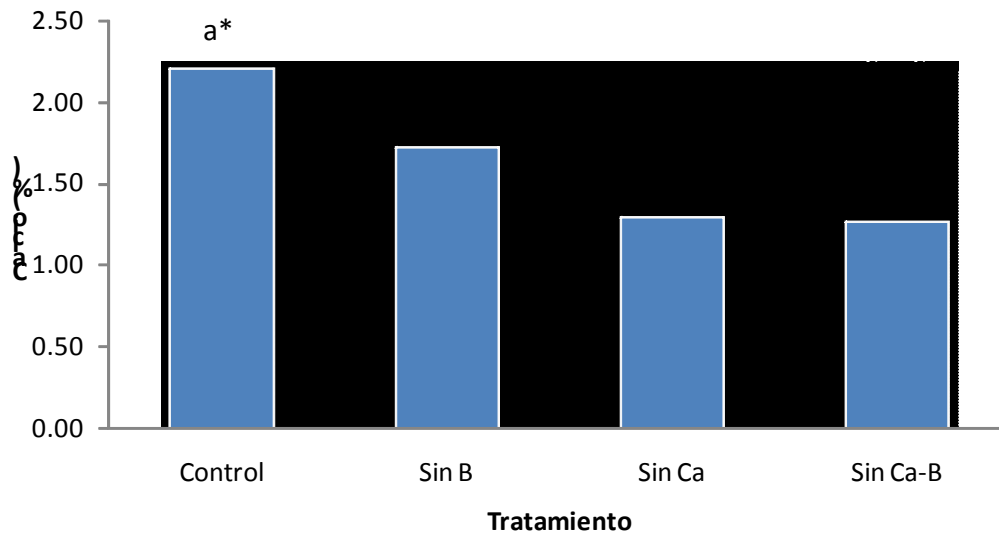


Gráfico 5. Concentración promedio de calcio en hojas de plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre 'Manetti' y 'Natal Briar'.

*Promedios seguidos de la misma letra no presentan evidencia de diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey HSD con una confianza del 95%.

Los datos obtenidos indican que las hojas son los únicos órganos evaluados en los cuales se presentan diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el tratamiento aplicado, siendo el tratamiento control el que presenta la mayor concentración del elemento y, como era de esperarse, las plantas sometidas a soluciones nutritivas desprovistas de calcio presentan las menores concentraciones del elemento.

Experimentos llevados a cabo por Torre *et al.* (2001) con plantas de rosa sometidas a condiciones de alta humedad relativa se encontró que el contenido de calcio fue estadísticamente mayor en las hojas que en otros órganos de la planta. Para Rahma y Punga (2007), la mayor concentración del elemento en las hojas puede ser debida a la formación de pectatos de calcio en la lamela media de las paredes celulares.

Según Marschner (1995), los tejidos que presentan baja transpiración como las flores y los frutos en comparación con las hojas se caracterizan por tener bajas tasas de translocación de elementos minerales como el calcio y el boro.

A pesar de lo anterior, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de calcio en las hojas respecto a tallos y botón floral como se esperaba, tampoco hubo diferencias debido al portainjerto utilizado. Este último resultado es similar al reportado por Cabrera (2002), en el cual plantas de rosa cv. Royalty, injertadas sobre 'Natal Briar' y 'Manetti' no presentaron diferencias significativas respecto a esta variable.

5.1.6. Concentración promedio de calcio en tallos

El gráfico 6 muestra la concentración promedio de calcio en los tallos de las plantas de rosa, indicando que existen diferencia en la concentración de dicho elemento de acuerdo al tratamiento evaluado.

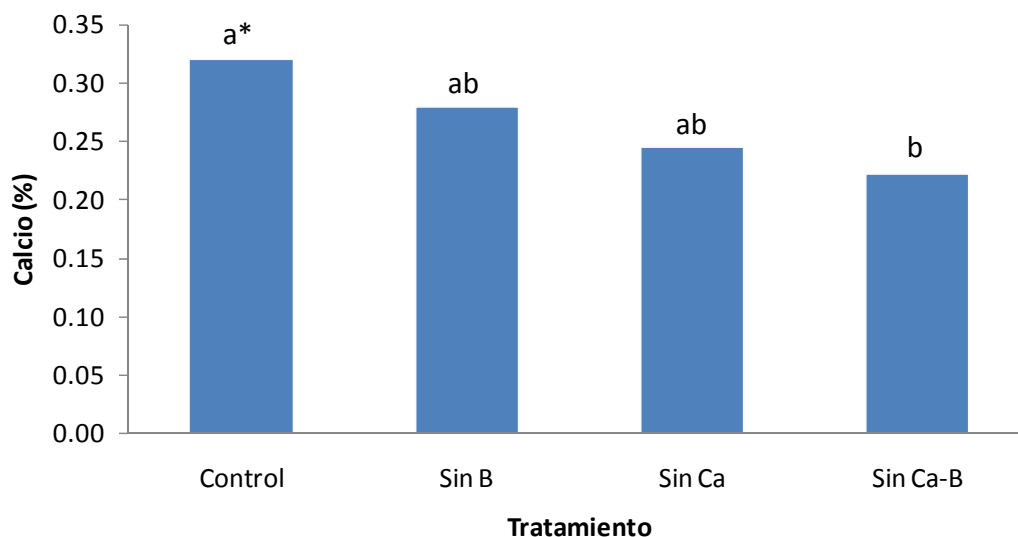


Gráfico 6. Concentración promedio de calcio en tallos de plantas de rosa cv Freedom injertadas sobre 'Manetti' y 'Natal Briar'.

*Promedios seguidos de la misma letra no presentan evidencia de diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey HSD con una confianza del 95%.

El comportamiento del contenido del calcio en los tallos fue similar al observado en el tejido foliar, presentando un valor significativamente mayor en el tratamiento control y significativamente menor en el tratamiento sin calcio y sin boro con valores intermedios en los demás tratamientos.

Estos resultados son coherentes con los tratamientos aplicados y fundamentan la relación sinérgica que se presenta entre el calcio y el boro, ya que en los tratamientos en los que el boro está ausente, se evidencia menor acumulación de calcio en el tejido, Esto puede ser debido al papel que cumplen los dos elementos en la conformación de estructuras celulares, particularmente en pared y membrana celular (Blower *et al.*, 1988; Roux y Slocum, 1982; Rahman y Punja, 2007; Blevins y Lukaszewski, 1998; Apostol y Zwiazek, 2004).

5.2 Determinación de parámetros colorimétricos

Los resultados indican que no existen diferencias significativas en cuanto a los parámetros colorimétricos Luminosidad (L^*), a^* , b^* , Croma (C^*) y Tono (h) en relación con los tratamientos aplicados, incluyendo la condición de frío a que fueron sometidos los tallos florales.

Estos resultados difieren de los encontrados en estudios anteriores, en los cuales, las aplicaciones foliares de soluciones que contenían calcio o boro más calcio modificaron el valor de algunos parámetros colorimétricos. En particular, en frutos de fresa cosechados de plantas a las cuales se les aplicó soluciones foliares de calcio y boro presentaron mayores valores de L^* , C^* y h^* , en comparación con los frutos de plantas que recibieron aplicaciones foliares solamente con boro o las plantas no tratadas (Singh *et al.*, 2007).

Es importante anotar que todos los tallos florales pertenecientes a los tratamientos manifestaron una afectación similar de ennegrecimiento de los pétalos externos en la etapa de poscosecha (Figura 2), los cuales se utilizaron para realizar las mediciones de los parámetros colorimétricos. De esta manera, es posible inferir que el estrés ocasionado por algún factor ambiental, posiblemente la baja temperatura nocturna que se presentó durante la etapa de crecimiento de los tallos florales, así como, la alta susceptibilidad de la variedad al fenómeno del ennegrecimiento produjeron una coloración similar que no permitió que la cuantificación de los parámetros colorimétricos difiriera entre los tratamientos.



Figura 2. Tallos florales del cv. Freedom afectados por ennegrecimiento de los pétalos.

5.3. Cuantificación de antocianinas monoméricas

Al analizar estadísticamente el efecto de los tratamientos aplicados, sobre la concentración total de antocianinas, se observa que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, incluyendo la condición de frío, a que fueron sometidos los tallos florales.

Estos resultados son contradictorios a los reportados por O'Neill y Gould (2003) y Whittaker *et al.* (2009), en los cuales se indica que la síntesis de antocianinas puede inducirse por condiciones ambientales como alta radiación lumínica, bajas temperaturas y deficiencias de elementos minerales como nitrógeno, fósforo, boro y manganeso.

Respecto al efecto que tiene la baja temperatura sobre la síntesis de antocianinas, Iglesias *et al.* (1999) indican que la concentración de estos pigmentos en la piel de frutas de manzana se correlacionaba inversamente con la temperatura.

De acuerdo con Lu *et al.* (2009), cerca del 52% de la variación del contenido de antocianinas en pétalos de diferentes cultivares de *Ipomoea purpurea* puede ser explicada por el efecto de la temperatura y la radiación UV. Así, las plantas cultivadas tanto en campo como en invernadero aumentaron la concentración de antocianinas cuando estuvieron expuestas a bajas temperaturas y alta radiación lumínica.

Adicionalmente, flores de diferentes variedades de *Plantago lanceolata*, sometidas a bajas temperaturas, incrementan la concentración de antocianinas, en comparación con las plantas que crecieron en temperaturas más altas. Adicionalmente, las variedades de *P. lanceolata* presentan diferencias significativas en relación con la cantidad total y la clase de antocianina (Stilesa *et al.* 2007).

Wei *et al.* (1999) encontraron que en los cultivos celulares de *Fragaria ananassa* cv. Shikinari, las bajas temperaturas incrementan el contenido de antocianinas pero disminuyen la tasa de crecimiento celular, sugiriendo que el estrés ocasionado por la disminución de la temperatura activa las enzimas involucradas en la síntesis de dichos pigmentos.

Por otra parte, plantas de rosa roja del cv. Jaguar sometidas a altas temperaturas transitorias (39°C y 10h, respectivamente) manifiestan una disminución en la pigmentación y en la actividad de las enzimas chalcona sintasa y dihidroflavonol reductasa, enzimas claves en la ruta de síntesis de las antocianinas, conllevando a una disminución en su concentración total. Además, el efecto de las altas temperaturas en la disminución de la pigmentación en este cultivar, depende del estadio del desarrollo del botón floral (Dela *et al.*, 2003).

En resumen, la expresión de los genes que hacen parte de la ruta de biosíntesis de las antocianinas es afectada significativamente por la temperatura. Las bajas temperaturas causan un incremento significativo en los productos de transcripción de los genes involucrados en los cambios de pigmentación y, por lo tanto, en la síntesis de esta clase de pigmentos (Dela *et al.*, 2003).

A pesar de lo anterior, en el presente estudio en los tratamientos con tallos florales sometidos a almacenamiento en bajas temperaturas (~4°C) no se constataron diferencias significativas en la concentración de antocianinas monoméricas. Una de las posibles causas de estos resultados puede deberse a que el efecto de la temperatura se probó en tallos cortados y no en plantas intactas. En estas, de acuerdo con O'Neill y Gould (2003)

y Whittaker *et al.* (2009) la temperatura conlleva a una alteración en la concentración de las antocianinas, como respuesta a una condición de estrés.

Es necesario considerar que, las plantas en campo, de donde se obtuvieron los tallos florales que se utilizaron en este ensayo soportaron bajas temperaturas nocturnas (datos no presentados) que se presentaron en diferentes estadios del desarrollo de los tallos florales.

De acuerdo con lo anterior, Halevy y Zieslin (1974), investigando los factores ambientales y bioquímicos implicados en el ennegrecimiento de los pétalos de rosa cv. Bacara encontraron que los pétalos de los tallos afectados contenían entre dos y cinco veces más antocianinas totales. Así mismo, la actividad de la polifenoloxidasa enzima responsable de la oxidación de fenoles, presentaba una actividad significativamente más alta, en comparación con los pétalos de los tallos florales no afectados. Las flores afectadas por los síntomas de ennegrecimiento fueron aquellas procedentes de plantas que crecieron fuera de los invernaderos, sometidas a bajas temperaturas nocturnas.

De acuerdo con los resultados del presente ensayo y a los previamente reportados sobre las causas del ennegrecimiento de los pétalos en rosas rojas (Cabrera *et al.*, 2007; Halevy y Zieslin, 1974), es posible inferir que la predisposición genética del cultivar y las bajas temperaturas son los factores que más influyen en la incidencia de este desorden fisiológico. Es probable que las condiciones nutricionales y los portainjertos utilizados para el desarrollo de las plantas de rosa cv. Freedom pueda considerarse factores secundarios.

Además, Cabrera *et al.* (2005) indican que las concentraciones de calcio y de boro en los tejidos de plantas de rosa no estarían directamente relacionadas con la afectación de los pétalos por el ennegrecimiento.

5.4 Relación de los parámetros colorimétricos y el contenido de antocianinas monoméricas

Los resultados encontrados en la correlación entre los parámetros colorimétricos determinados y la concentración de antocianinas monoméricas indican que existe una correlación moderada entre la concentración de antocianinas monoméricas y los parámetros L*, b* y tono (h°), mientras que no existe correlación con los parámetros a* y croma (C).

En estudios con especies de flores de *Paeonia*, no han encontrado una tendencia clara entre los valores de los parámetros colorímetros L^* y a^* y la cantidad de antocianinas totales, ya que en algunas especies se presenta una correlación positiva y en otras negativa (Zhan *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2008). Se espera una correlación negativa entre el parámetro colorimétrico L^* y la concentración de antocianinas, ya que al aumentar la concentración de estos pigmentos, el color debe estar más acentuado. Sin embargo, en otros cultivares caracterizados por pétalos jaspeados, dicha tendencia no se presenta, ya que los valores de L^* no se modifican al aumentar el contenido de antocianinas (Jakopic *et al.*, 2007).

Por otra parte, Schmitzer *et al.* (2009) encontraron una alta correlación entre la concentración de antocianinas, en especial en forma de cianidina 3-glucosido, y los valores colorimétricos de hojas de *Acer palmatum*. Este árbol manifiesta variación en la coloración de sus hojas de acuerdo con la posición que ocupan en el árbol: las hojas más verdes ubicadas en la base del árbol presentan menor valor de a^* y mayores valores b^* , L^* y h° , mientras que las hojas de coloración roja, ubicadas en la parte superior del árbol manifiestan mayor valor de a^* y menores de b^* , L^* y h° (Schmitzer *et al.*, 2009). Tendencias similares fueron observadas por Lu *et al.* (2009) en variedades de *Ipomoea purpurea*, en donde se encontró una correlación positiva con a^* y negativa con L^* y h^* .

La clase y la concentración de antocianinas son factores fundamentales en la coloración de los pétalos de las flores, determinan las relaciones positivas o negativas que se presentan entre los diferentes componentes colorimétricos medidos.

Por ejemplo, en diferentes variedades de *Paeonia lactiflora*, con flores jaspeadas, con antocianinas constituidos a base de glucósidos de cianidina, no se evidencia una relación significativa entre el componente colorimétrico L^* y las antocianinas totales, ya que los valores de L^* no se modifican al incrementar dichos pigmentos. Por el contrario, en las variedades con flores de un color uniforme, con antocianinas constituidas principalmente por glucósidos de peonidina, se presenta una relación negativa, es decir, que los valores de L^* disminuyen al aumentar el contenido de antocianinas totales. En las flores del primer grupo también se evidenció una correlación negativa entre el componente colorimétrico a^* y las antocianinas totales, ya que el valor de a^* disminuía al incrementar la cantidad de antocianinas totales. Mientras que para el segundo tipo de flores se observa una relación positiva entre las dos variables (Zhang *et al.*, 2007).

Por lo anterior, se deduce que no existe una tendencia única entre el contenido de antocianinas y los componentes colorimétricos, debido a que la coloración de los pétalos depende de mecanismos de copigmentación, en donde participan, pH, flavonoides, flavones y elementos minerales como Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{+2} y Mg^{2+} (Zhang *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2008).

6. Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- Las plantas de rosa cv. Freedom injertadas sobre 'Natal Briar' acumulan en sus tejidos mayores concentraciones de boro y calcio.
- La privación de calcio y de boro en la solución nutritiva de plantas de rosa cv. Freedom afecta la acumulación de boro y de calcio en los tejidos de las plantas respectivamente; lo que confirma el sinergismo que estos dos elementos tienen en la fisiología de las plantas.
- En las condiciones en que se llevó a cabo el ensayo, el contenido de pigmentos del tipo de las antocianinas no mostraron diferencias significativas respecto a los tratamientos aplicados. De esta manera, se infiere que las condiciones ambientales presentadas durante el desarrollo de las plantas puede tener una implicación más directa en el ennegrecimiento de los pétalos comparado con el balance nutricional.

A. Anexo: Análisis estadístico

The GLM Procedure

Organo=Flor

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca sin B
Rep	4	1 2 3 4

Number of observations	32
-------------------------------	----

The GLM Procedure

Dependent Variable: Ca
Ca

Organo=Flor

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	0.16068112	0.01606811	1.55	0.1908
Error	21	0.21780109	0.01037148		
Corrected Total	31	0.37848222			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Ca Mean
0.424541	46.03463	0.101840	0.221226

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Rep	3	0.03947298	0.01315766	1.27	0.3108
Patron	1	0.08021308	0.08021308	7.73	0.0112
Fert	3	0.01436877	0.00478959	0.46	0.7119
Patron*Fert	3	0.02662630	0.00887543	0.86	0.4793

The GLM Procedure

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	----------------	------------	-----------

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Ca

Organo=Flor

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	0.010371
Critical Value of Studentized Range	2.94102
Minimum Significant Difference	0.0749

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Patron
A	0.27129	16	Natal B.
B	0.17116	16	Manetti

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Patron
----------------	------	---	--------

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Ca

Organo=Flor

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	0.010371
Critical Value of Studentized Range	3.94188
Minimum Significant Difference	0.1419

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Fert
----------------	------	---	------

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	Fert
A	0.25102	8	Sin B
A			
A	0.22904	8	Control
A			
A	0.21078	8	Sin Ca
A			
A	0.19406	8	Sin Ca sin B

The GLM Procedure

Organo=Hojas

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca sin B
Rep	4	1 2 3 4

Number of observations	32
------------------------	----

The GLM Procedure

*Dependent Variable: Ca
Ca*

Organo=Hojas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	5.09419856	0.50941986	8.68	<.0001
Error	21	1.23279503	0.05870453		
Corrected Total	31	6.32699359			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Ca Mean
0.805153	14.94243	0.242290	1.621491

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Rep	3	0.12774081	0.04258027	0.73	0.5482
Patron	1	0.24869414	0.24869414	4.24	0.0522
Fert	3	4.66230435	1.55410145	26.47	<.0001
Patron*Fert	3	0.05545926	0.01848642	0.31	0.8144

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Ca

Organo=Hojas

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21

Error Mean Square	0.058705
Critical Value of Studentized Range	2.94102
Minimum Significant Difference	0.1781

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	Patron
A	1.70965	16	Natal B.
A			
A	1.53333	16	Manetti

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Ca

Organo=Hojas

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	0.058705
Critical Value of Studentized Range	3.94188
Minimum Significant Difference	0.3377

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	Fert
A	2.2053	8	Control
B	1.7190	8	Sin B
C	1.2957	8	Sin Ca
C			
C	1.2661	8	Sin Ca sin B

The GLM Procedure

Organo=Tallo

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca sin B
Rep	4	1 2 3 4

Number of observations	32
------------------------	----

Organo=Tallo

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Ca Mean
0.426971	24.69011	0.065822	0.266594

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Rep	3	0.00524119	0.00174706	0.40	0.7522

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Patron	1	0.00045957	0.00045957	0.11	0.7479
Fert	3	0.04470234	0.01490078	3.44	0.0354
Patron*Fert	3	0.01739053	0.00579684	1.34	0.2889

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Ca

Organo=Tallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	0.004333
Critical Value of Studentized Range	2.94102
Minimum Significant Difference	0.0484

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	Patron
A	0.27038	16	Natal B.
A			
A	0.26280	16	Manetti

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Ca

Organo=Tallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	0.004333
Critical Value of Studentized Range	3.94188
Minimum Significant Difference	0.0917

Means with the same letter are not significantly different.				
Tukey Grouping		Mean	N	Fert
	A	0.32059	8	Control
	A			
B	A	0.27931	8	Sin B
B	A			
B	A	0.24519	8	Sin Ca
B				
B		0.22129	8	Sin Ca sin B

2.

The GLM Procedure

Organo=Flor

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Patron	2	Manetti Natal B.

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca sin B
Rep	4	1 2 3 4

Number of observations	32
------------------------	----

The GLM Procedure

Dependent Variable: Bo Bo

Organo=Flor

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	2251.343475	225.134347	0.82	0.6157
Error	21	5779.906317	275.233634		
Corrected	31	8031.249792			

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Total					

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Bo Mean
0.280323	55.34014	16.59017	29.97854

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Rep	3	562.222777	187.407592	0.68	0.5735
Patron	1	24.802703	24.802703	0.09	0.7670
Fert	3	1476.821255	492.273752	1.79	0.1802
Patron*Fert	3	187.496740	62.498913	0.23	0.8765

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Bo**Organo=Flor**

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	275.2336
Critical Value of Studentized Range	2.94102
Minimum Significant Difference	12.198

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Patron
A	30.859	16	Natal B.
A			
A	29.098	16	Manetti

*The GLM Procedure***Organo=Hojas**

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca sin B
Rep	4	1 2 3 4

Number of observations	32
-------------------------------	----

*The GLM Procedure**Dependent Variable: Bo Bo***Organo=Hojas**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	11223.87253	1122.38725	2.77	0.0237
Error	21	8514.76487	405.46499		
Corrected Total	31	19738.63740			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Bo Mean
0.568624	24.34839	20.13616	82.70018

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Rep	3	671.010405	223.670135	0.55	0.6526
Patron	1	3911.625016	3911.625016	9.65	0.0053
Fert	3	1458.419848	486.139949	1.20	0.3344
Patron*Fert	3	5182.817264	1727.605755	4.26	0.0169

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Bo

Organo=Hojas

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	405.465
Critical Value of Studentized Range	2.94102
Minimum Significant Difference	14.805

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Patron
A	93.756	16	Natal B.

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	Patron
B	71.644	16	Manetti

The GLM Procedure

Organo=Tallo

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca sin B
Rep	4	1 2 3 4

Number of observations	32
-------------------------------	----

The GLM Procedure

Dependent Variable: Bo Bo

Organo=Tallo

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	2399.190152	239.919015	0.73	0.6888
Error	21	6898.768167	328.512770		
Corrected Total	31	9297.958319			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Bo Mean
0.258034	65.41038	18.12492	27.70955

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Rep	3	196.769208	65.589736	0.20	0.8954

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Patron	1	0.071189	0.071189	0.00	0.9884
Fert	3	1205.741833	401.913944	1.22	0.3259
Patron*Fert	3	996.607922	332.202641	1.01	0.4075

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Bo

Organo=Tallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	21
Error Mean Square	328.5128
Critical Value of Studentized Range	2.94102

Minimum Significant Difference	13.326
---------------------------------------	--------

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	Patron
A	27.757	16	Natal B.
A			
A	27.662	16	Manetti

3.

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Bloque	4	1 2 3 4
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca-B
Frio	2	Con sin

Number of observations	64
-------------------------------	----

NOTE: All dependent variables are consistent with respect to the presence or absence of missing values. However only 58 observations can be used in this analysis.

The GLM Procedure

*Dependent Variable: a_ a**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	374.924146	34.084013	0.74	0.6911
Error	46	2106.666205	45.797091		
Corrected Total	57	2481.590352			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	a_ Mean
0.151082	19.26810	6.767355	35.12207

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	99.4290276	99.4290276	2.17	0.1474
Bloque	3	66.9523254	22.3174418	0.49	0.6928
Patron	1	32.4421276	32.4421276	0.71	0.4043
Fert	3	113.2966749	37.7655583	0.82	0.4871
Patron*Fert	3	56.6898995	18.8966332	0.41	0.7447

The GLM Procedure

*Dependent Variable: b_ b**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	106.2873136	9.6624831	0.93	0.5244
Error	46	479.9927433	10.4346249		
Corrected	57	586.2800569			

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Total					

R-Square	Coeff Var	Root MSE	b_ Mean
0.181291	23.07191	3.230267	14.00086

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	1.57245690	1.57245690	0.15	0.6997
Bloque	3	20.28305814	6.76101938	0.65	0.5883
Patron	1	19.17714510	19.17714510	1.84	0.1818
Fert	3	30.09399355	10.03133118	0.96	0.4190
Patron*Fert	3	19.45618585	6.48539528	0.62	0.6047

The GLM Procedure

Dependent Variable: Cromo Cromo

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	426.959209	38.814474	0.81	0.6290
Error	46	2201.525468	47.859249		
Corrected Total	57	2628.484677			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Cromo Mean
0.162435	18.24864	6.918038	37.90989

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	93.4439725	93.4439725	1.95	0.1690
Bloque	3	72.2698607	24.0899536	0.50	0.6819
Patron	1	48.0354139	48.0354139	1.00	0.3217
Fert	3	135.4943970	45.1647990	0.94	0.4273

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Patron*Fert	3	60.6302674	20.2100891	0.42	0.7379

The GLM Procedure

Dependent Variable: Tono__h__ Tono (h°)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	124.864763	11.351342	0.51	0.8839
Error	46	1015.654911	22.079455		
Corrected Total	57	1140.519674			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Tono__h__ Mean
0.109481	21.46368	4.698878	21.89222

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	17.62980222	17.62980222	0.80	0.3762
Bloque	3	41.24395096	13.74798365	0.62	0.6040
Patron	1	18.14155177	18.14155177	0.82	0.3694
Fert	3	1.02338246	0.34112749	0.02	0.9973
Patron*Fert	3	31.31913703	10.43971234	0.47	0.7027

The GLM Procedure

Dependent Variable: _b__a__ (b/a*)*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.05472068	0.00497461	0.50	0.8949
Error	46	0.45979580	0.00999556		
Corrected	57	0.51451649			

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Total					

R-Square	Coeff Var	Root MSE	_b__a__ Mean
0.106354	24.68678	0.099978	0.404985

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	0.00769155	0.00769155	0.77	0.3849
Bloque	3	0.01937589	0.00645863	0.65	0.5894
Patron	1	0.00789328	0.00789328	0.79	0.3788
Fert	3	0.00014572	0.00004857	0.00	0.9995
Patron*Fert	3	0.01317740	0.44	0.7259	

4.

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Bloque	4	1 2 3 4
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca-B
Frio	2	Con sin

Number of observations	64
-------------------------------	----

NOTE: All dependent variables are consistent with respect to the presence or absence of missing values. However only 58 observations can be used in this analysis.

The GLM Procedure

*Dependent Variable: a_ a**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
---------------	-----------	-----------------------	--------------------	----------------	------------------

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	374.924146	34.084013	0.74	0.6911
Error	46	2106.666205	45.797091		
Corrected Total	57	2481.590352			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	a_ Mean
0.151082	19.26810	6.767355	35.12207

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	99.4290276	99.4290276	2.17	0.1474
Bloque	3	66.9523254	22.3174418	0.49	0.6928
Patron	1	32.4421276	32.4421276	0.71	0.4043
Fert	3	113.2966749	37.7655583	0.82	0.4871
Patron*Fert	3	56.6898995	18.8966332	0.41	0.7447

The GLM Procedure

Dependent Variable: b_ b*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	106.2873136	9.6624831	0.93	0.5244
Error	46	479.9927433	10.4346249		
Corrected Total	57	586.2800569			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	b_ Mean
0.181291	23.07191	3.230267	14.00086

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	1.57245690	1.57245690	0.15	0.6997
Bloque	3	20.28305814	6.76101938	0.65	0.5883

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Patron	1	19.17714510	19.17714510	1.84	0.1818
Fert	3	30.09399355	10.03133118	0.96	0.4190
Patron*Fert	3	19.45618585	6.48539528	0.62	0.6047

The GLM Procedure

Dependent Variable: Cromo Cromo

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	426.959209	38.814474	0.81	0.6290
Error	46	2201.525468	47.859249		
Corrected Total	57	2628.484677			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Cromo Mean
----------	-----------	----------	------------

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Croma Mean
0.162435	18.24864	6.918038	37.90989

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	93.4439725	93.4439725	1.95	0.1690
Bloque	3	72.2698607	24.0899536	0.50	0.6819
Patron	1	48.0354139	48.0354139	1.00	0.3217
Fert	3	135.4943970	45.1647990	0.94	0.4273
Patron*Fert	3	60.6302674	20.2100891	0.42	0.7379

The GLM Procedure

Dependent Variable: Tono__h__ Tono (h°)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	-------------	---------	--------

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	124.864763	11.351342	0.51	0.8839
Error	46	1015.654911	22.079455		
Corrected Total	57	1140.519674			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Tono__h__ Mean
0.109481	21.46368	4.698878	21.89222

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	17.62980222	17.62980222	0.80	0.3762
Bloque	3	41.24395096	13.74798365	0.62	0.6040
Patron	1	18.14155177	18.14155177	0.82	0.3694
Fert	3	1.02338246	0.34112749	0.02	0.9973
Patron*Fert	3	31.31913703	10.43971234	0.47	0.7027

The GLM Procedure

Dependent Variable: _b__a__ (b/a*)*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.05472068	0.00497461	0.50	0.8949
Error	46	0.45979580	0.00999556		
Corrected Total	57	0.51451649			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	_b__a__ Mean
0.106354	24.68678	0.099978	0.404985

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	0.00769155	0.00769155	0.77	0.3849
Bloque	3	0.01937589	0.00645863	0.65	0.5894

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Patron	1	0.00789328	0.00789328	0.79	0.3788
Fert	3	0.00014572	0.00004857	0.00	0.9995

Patron*Fert 3 0.01317740 0.00439247 0.44 0.7259

5.

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Bloque	4	1 2 3 4
Patron	2	Manetti Natal B.
Fert	4	Control Sin B Sin Ca Sin Ca-B
Frio	2	Con sin

Number of observations	64
-------------------------------	----

NOTE: All dependent variables are consistent with respect to the presence or absence of missing values. However only 51 observations can be used in this analysis.

The GLM Procedure

Dependent Variable:

Antocianinas__monomericas_mg_100 Antocianinas__monomericas mg/100g

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	789.649162	71.786287	0.71	0.7189
Error	39	3926.833001	100.688026		
Corrected Total	50	4716.482163			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Antocianinas__monomericas_mg_100 Mean
0.1674 23	60.177 21	10.034 34	16.67466

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	20.1663502	20.1663502	0.20	0.6570
Bloque	3	78.6482672	26.2160891	0.26	0.8535

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Patron	1	223.7662538	223.7662538	2.22	0.1441
Fert	3	87.8597018	29.2865673	0.29	0.8317
Patron*Fert	3	318.6946577	106.2315526	1.06	0.3792

The GLM Procedure

*Dependent Variable: antocianinas__mg_muestra
antocianinas mg/muestra*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.00476026	0.00043275	0.72	0.7084
Error	39	0.02329556	0.00059732		
Corrected Total	50	0.02805582			

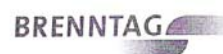
R-Square	Coeff Var	Root MSE	antocianinas__mg_muestra Mean

R-Square	Coeff Var	Root MSE	antocianinas__mg_muestra Mean
0.169671	65.37484	0.024440	0.037385

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Frio	1	0.00037279	0.00037279	0.62	0.4343
Bloque	3	0.00049862	0.00016621	0.28	0.8407
Patron	1	0.00185740	0.00185740	3.11	0.0857
Fert	3	0.00055628	0.00018543	0.31	0.8177
Patron*Fert	3	0.00101176	0.00033725	0.56	0.6416

B. Anexo: Soluciones nutritivas utilizadas en el ensayo

Brenntag Colombia S.A.



Mosquera, 9 de Febrero de 2009

Señores:
UNIVERSIDAD NACIONAL
Bogotá

Apreciados Señores:

A continuación relacionamos el análisis de su fórmula de AGROFEED así:

Formula: Rosa (sin B)

N	P	K	Ca	Mg	S	Mn	Zn	Cu	Fe	B	Mo
170	35	150	110	60	82	1	0.5	0.5	3	--	0.1

Unidad de Cotización: ppm

Referencia : AGRUNA.24 AGRUNA.17
Factor de Dilución : 1:667 1:286
pH Solución Final : 5.5 - 6.0 (Alcalinidad del agua de riego 1.0 m mol CaCO₃)

COMPOSICION GARANTIZADA COMPOSICION GARANTIZADA
AGROFEED AGRUNA.24 AGROFEED AGRUNA.17
Gramos/Litro Gramos/Litro

N-TOTAL	113.30	N-TOTAL	0.00
N-NH ₄	17.00	N-NH ₄	0.00
N-NO ₃	96.30	N-NO ₃	0.00
P	0.00	P	10.00
K	0.00	K	42.90
Ca	73.30	Ca	0.00
Mg	24.00	Mg	6.80
S	0.00	S	23.50
Mn	0.66	Mn	0.00
Zn	0.33	Zn	0.00
Cu	0.33	Cu	0.00
Fe	2.00	Fe	0.00
B	0.00	B	0.00
Mo	0.06	Mo	0.00

Nota: Microelementos 100% quelatados con DTPA



OFICINAS DE VENTAS

NIT 800.002.590-3

IMPORTADOR - PRODUCTOR

MOSQUERA: CARRETERA TRONCAL OCCIDENTE KM. 13 TELEFONO 294 2420 FAX 294 0463 APARTADO AEREO 80263
BARRANGULLA: CALLE 20 No. 18-289 AUTOPISTA AL AEROPUERTO TELEFONO 283 5300 FAX 283 5301 APARTADO AEREO 125
CALI: CALLE 19 No. 50-155 ARROYOCHONDO TELEFONO 881 0800 FAX 881 4029 APARTADO AEREO 4811
ITAGUÉ: CALLE 50 No. 45-94 AUTOPISTA SUR (TAGUÉ) TELEFONO 375 5000 FAX 375 5081 APARTADO AEREO 1432



Brenntag Colombia S.A.



Mosquera, 9 de Febrero de 2009

Señores:
UNIVERSIDAD NACIONAL
 Bogotá

Apreciados Señores:

A continuación relacionamos el análisis de su fórmula de AGROFEED así:

Formula: **Rosa (sin Ca y B)**

N	P	K	Ca	Mg	S	Mn	Zn	Cu	Fe	B	Mo
170	35	150	--	60	82	1	0.5	0.5	3	--	0.1

Unidad de Cotización : ppm

Referencia : **AGRUNA.23** **AGRUNA.17**
 Factor de Dilución : **1:1000** **1:286**
 pH Solución Final : 5.5 - 6.0 (Alcalinidad de agua de riego 1.0 m mol CaCO3)

COMPOSICION GARANTIZADA COMPOSICION GARANTIZADA
AGROFEED AGRUNA.23 **AGROFEED AGRUNA.17**
 Gramos/Litro Gramos/Litro

	AGRUNA.23		AGRUNA.17
N-TOTAL	170.00	N-TOTAL	0.00
N-NH4	64.00	N-NH4	0.00
N-NO3	106.00	N-NO3	0.00
P	0.00	P	10.00
K	0.00	K	42.90
Ca	0.00	Ca	0.00
Mg	36.00	Mg	6.80
S	0.00	S	23.50
Mn	1.00	Mn	0.00
Zn	0.50	Zn	0.00
Cu	0.50	Cu	0.00
Fe	3.00	Fe	0.00
B	0.00	B	0.00
Mo	0.10	Mo	0.00

Nota: Microelementos 100% quelatados con DTPA



OFICINAS DE VENTAS #11 860.002.580-3 IMPORTADOR - PRODUCTOR

MOSQUERA: CARRETERA TENDILCOO DE VIEKY 14	TELÉFONO 664 4420	FAX 664 4423	APARTADO AEREO 61022
SARRIQUILLA: CALLE 3074, SECC. AUTOPISTA AL REPUERTO	TELÉFONO 667 6870	FAX 667 6870	APARTADO AEREO 100
CALÍ: CALLE 1011, 20-163 ARRIVANDO LDC	TELÉFONO 651 6101	FAX 651 4222	APARTADO AEREO 4811
ITAGÜE: CALLE 3111, AV. AUTOPISTA SUR, ITAGÜE	TELÉFONO 676 6655	FAX 676 6655	APARTADO AEREO 1420



Brenntag Colombia S.A.



Mosquera, 9 de Febrero de 2009

Señores:
UNIVERSIDAD NACIONAL
 Bogotá

Apreciados Señores:

A continuación relacionamos el análisis de su fórmula de AGROFEED así:

Formula: **Rosa (sin Ca y B)**

N	P	K	Ca	Mg	S	Mn	Zn	Cu	Fe	B	Mo
170	35	150	--	60	82	1	0.5	0.5	3	--	0.1

Unidad de Cotización: ppm

Referencia : **AGRUNA.23** **AGRUNA.17**
 Factor de Dilución : **1:1000** **1:286**
 pH Solución Final : 5.5 - 6.0 (Alcalinidad de agua de riego 1.0 m mol CaCO₃)

COMPOSICIÓN GARANTIZADA COMPOSICIÓN GARANTIZADA
AGROFEED AGRUNA.23 **AGROFEED AGRUNA.17**
 Gramos/Litro Gramos/Litro

	AGRUNA.23		AGRUNA.17
N-TOTAL	170.00	N-TOTAL	0.00
N-NH ₄	64.00	N-NH ₄	0.00
N-NO ₃	106.00	N-NO ₃	0.00
P	0.00	P	10.00
K	0.00	K	42.90
Ca	0.00	Ca	0.00
Mg	36.00	Mg	6.80
S	0.00	S	23.50
Mn	1.00	Mn	0.00
Zn	0.50	Zn	0.00
Cu	0.50	Cu	0.00
Fe	3.00	Fe	0.00
B	0.00	B	0.00
Mo	0.10	Mo	0.00

Nota: Microelementos 100% quelatados con DTPA



OFICINAS DE VENTAS

MOSQUERA: CARRETERA TRONCALCOO DOTE KIT 14
BARRANQUILLA: CALLE 2014 15450 AUTOPISTA AL RESERVIADO
CALI: CALLE 10 1 03160 ARBOVEDANOS
ITAGUI: CALLE 5114 0444 AUTOPISTA SUR NOROCC.

NIT 860.002.280-3

IMPORTADOR - PRODUCTOR

TELEFONO 860 4100 FAX 860 4100 APARTADO 46600 1100
TELEFONO 241 6870 FAX 241 6170 APARTADO 46600 1100
TELEFONO 851 0007 FAX 851 4220 APARTADO 46700 4611
TELEFONO 076 6660 FAX 076 6660 APARTADO 46700 1135



Bibliografía

- Aloni, B. 1986. Enhancement of leaf tipburn by restricting root growth in Chinese cabbage plants. *Journal. Horticulture Science*, 61:509-513.
- Apostol, K. and Zwiazek, J. 2004. Boron and water uptake in jack pine (*Pinus Banksiana*) seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 51(2):145-153.
- Bellaloui, N. and Brown, P.H. 1998. Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon sculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Soil*, 198:153-158.
- Biran, H.Z. and Halevy, H.A. 1974. Effects of varying light intensities and temperature treatments applied to whole plants, or locally to leaves or flower buds, on growth and pigmentation of 'Baccara' roses. *Physiology Plant*, 31:175-179.
- Blevins, D. And Lukaszewski, K. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review Plant Physiology*, 49:481-500.
- Bolaños, L.; Lukaszewski, K.; Bonilla, I.; Blevins, D. 2004. Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry*. 42(11): 907-912.
- Brar, H., Singh, Z. and Swinny, E. 2008. Dynamics of anthocyanin and flavonol profiles in the 'Crimson Seedless' grape berry skin during development and ripening. *Scientia Horticulturae*, 117:349-356.
- Cabrera, R., Solís-Pérez, A. and McCormick, J. 2007. The role of calcium and boron in rose development and petal blackening: Observations commercial rose greenhouse and shoot tissue nutrient status. *Progress Report (July to December)*. Texas University.
- Cabrera, R. 2002. Rose yield, dry matter partitioning and nutrient status responses to rootstock selection. *Scientia Horticulturae*, 95:75-83.
- Cabrera, R. 2006. Consideraciones sobre nutrición mineral y fertilización en rosas. En: *avances sobre fertirriego en la floricultura colombiana*. P 145-161.
- Calderón, F. y Ceballos, F. 2003. Los sustratos. En: <http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones>.

- Calvo, C. 1989. Atlas de color. Fundamentos y aplicaciones. Review Agroquímica y Tecnología Alimentaria, 29(1):15-29.
- Camacho-Cristobal, J.; Maldonado, J. and González-Fontes, A. 2004. Boron deficiency increase putrescine levels in tobacco plants. Journal of Plant Physiology, 162, 1(8):921-928.
- Capdeville, G; Maffia, L; Finger, F; and Ulisses G. Batista, U. 2005. Pre-harvest calcium sulfate applications affect vase life and severity of gray mold in cut roses. Scientia Horticulturae, 103(3): 329-338.
- Cara, F.; Sánchez, E.; Ruiz, J. And Romero, L. 2002. Is phenol oxidation responsible for the short term effect of boron deficiency on plasma-membrane permeability and function in squash root? Plant Physiology and Biochemistry, 40(10):853-858.
- Carpene, R.; Esteban, E.; Sarro, Penalosa, J.; Garate, A.; Lucena, J.; Zornoza, P. 2005. Boron and calcium distribution in nitrogen – fixing pea plant. Plant Science, 15:163-170.
- Chiu, T.F., 1976. Effects of shortage of calcium and other cation on Ca mobility, growth and nutritional disorders of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*). Journal Science Food Agriculture, 27:969-977.
- Collier, G.F., Tibbitts, T.W., 1982. Tipburn of lettuce. Horticulture. Review, 4: 49-65.
- Cross, M 2000. Quality and Postharvest Performance of Cut Roses Grown in Root Media Containing Coal Bottom Ash. Tesis Ph.D. College of Agriculture and Forestry at West Virginia University.
- Cresswell, G.C., Weir, R.G., 1997. Plant Nutrient Disorders 5: Ornamental Plants and Shrubs. Inkata Press, Melbourne.
- Dela, G.; Or, E.; Ovadia, R.; Nissim-Levi, A., David Weiss, D.; Oren-Shamir, M. 2003. Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. Plant Science, 164:333–340.
- Epstein, E. 1973. Flow in the phloem and the immobility of calcium and boron: A new hypothesis in support of an old one. Experientia, 29:133-136
- Evans, R.; Cabrera, R.; Dodgeand, L.; Zheng, J. 2005. The Involvement of calcium and boron in rose petal blackening.
- Federación Nacional de Cafetero de Colombia, Centro Nacional de Café, CENICAFE. 1994. Manual de Laboratorio para Análisis Foliares.

- Ferguson, I.B., Drobak, B.K., Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *Horticulture Science*, 23: 262-266.
- Fletcher, R.; Gilley, A.; Sankhla, N.; Davis, T. 2000. Triazoles as plant growth regulator and stress protectants. *Horticulture, Review*. 24: 55-138.
- Florez R., J., Miranda Lasprilla, D. y Parra, R. 2002. Situación del Agrosistema y características de la producción de rosas en la sabana de Bogota, Colombia. En: *Situación de la agroplasticultura en países iberoamericanos*. Programa CYTED, Madrid, 105-121.
- Franco, J.; Perez-Saura.; Fernandez, J.; Parra, M.; Garcia, A. 1999. Effect of two irrigation rates on yield, incidence of blossom- end rot, mineral content and free amino acid levels in tomato cultivated under drip irrigation using saline water. *Journal Horticulture. Science Biotechnology*, 74: 430-13.
- Franck, Ch., Lammertyn, J., Ho, Q., Verboven, P., Verlinden, B., Nicola, M. 2007. Browning disorders in pear fruit. *Review Postharvest Biology and Technology*, 43:1-13.
- Ghanati, F.; Morita, A, and Yokota, H. 2005. Deposition of Suberin in root of soybean induced by excess boron, *Plant Science* 168(2):397 - 405.
- Giusti, M. y Wrolstad, R. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV – Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. F1.2.1–F1.2.13
- Gonnet, J.F., 1998. Color effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited. 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chemical*. 63: 409-415.
- Grattan. S.; Grieve, C. 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulture*, 78: 127-157.
- Grotewold, E. 2006. The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. *Annual Review Plant Biology*, 57:761-80.
- Grunzweig, J.; Rabinowich, H.; Katan J.; Wodner, M.; Ben – Tal, Y. 2000. Involvement of endogenous gibberellins in the regulation of increased tomato shoot growth in solarized soil. *Plant Growth Regulator*, 30: 233–239.
- Gupta, U. 2007. Boron. En *Handbook of Plant Nutrition*. Edited by Barker D. Taylor and Francis Group.
- Hadi, M.; Conway, W.; Sam, C. 1996. Effect of calcium on yield and incidence of blossom-end rot of three tomato cultivars, *Horticulture Science*, 31:672-679.

- Halevy, A. and Zieslin, N. 1974. The development and causes of petal blackening and malformation of "Baccara" rose flower. *Acta Horticulturae* 14.
- Hamazu, Y., Hanakawa, T., 2003. Relation of highly polymerised procyanidin to the potential browning susceptibility in pear fruits. *Journal Horticulture. Science*, 72: 415-421.
- Harbaugh, B.K., Woltz, S.S., 1989. Fertilization practice and foliar-bract calcium sprays reduce incidence of marginal bract necrosis of poinsettia. *Horticulture Science*, 24: 465-468.
- Imsabai W., Ketsa, S; Wouter G. Doorn, V. 2010. Role of ethylene in the lack of floral opening and in petal blackening of cut lotus (*Nelumbo nucifera*) flowers. *Postharvest Biology and Technology* 58: 57-64.
- Ishii, T. And Matsunaga, T. 2001. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan *Phytochemistry*, 57: 969- 974.
- Jakopic, J.; Veberic, R.; Stampar, F. 2007. The effect of reflective foil and hail nets on the lighting, color and anthocyanins of 'Fuji' apple. *Scientia Horticulturae*, 115: 40-46.
- Jakopic J., Stampar F., Veberic R. 2009. The influence of exposure to light on the phenolic content of 'Fuji' apple. *Scientia Horticulturae*, 123: 234- 239.
- Jia, N.; Shu, Q-Y.; Wang, L-S.; Dua, H.; Xu, Y-J; Liu, Z-A. 2008. Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars. *Scientia Horticulturae* 117: 167-173.
- Jones R.B and Clayton – Greene K. 1992. The role of photosynthesis and oxidative reactions in leaf blackening of *Protea neriifolia* R. Br. Leaves. *Scientia Horticulturae*, 50: 137–145.
- Jungmin, L.; Rennaker, Ch.; Wrolstad, E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 110: 782–786.
- Karabal, E.; Yücel, M.; and Avni H. 2003. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity *ant Science*. 164 (6): 925 -933.
- Leguizamon, G.V.; Gonzalez L.A. y Baez. S, R. 2005. Grape Anthocyanins (*Vitis vinifera* L.) and their relation to color. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol 28, (4): 359-368.

- Lehto, T.; Räisänen, M.; Lavola, A.; Julkunen-Titto, R.; and Aphalo, P. 2004. Boron movility in deciduos forest trees in relation to their polylys. *New Phytologist*, 163: 333-339.
- Leiva., D,D. 2009. Determinacion de Antocianinas, Fenoles Totales y Actividad Antioxidante en Licores y Fruto de Mora. Tesis. Universidad Tecnologica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- Liang, W.; Wang, M.; Ai, X. 2009. The role of calcium in regulating photosynthesis and related physiological indexes of cucumber seedlings under low light intensity and suboptimal temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 123: 34-38.
- López-Gómez, E.; San Juan, M.; Diaz-Vivancos, A.; J. Mataix Beneyto, J.; García M.; Hernández. 2007. Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidant systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.) *Environmental and Experimental Botany*, (60): 151-158.
- Lu, Y.; Du, J.; Tang, J.; Wang, F.; Zhang, J.; Huang, J.; Liang, W.; Wang, L. 2009. Environmental regulation of floral anthocyanin synthesis in *Ipomoea purpurea*. *Molecular Ecology*, 18: 3857-3871.
- Mahajan, B., Dhatt, A., 2004. Studies on postharvest calcium chloride application on storage behaviour and quality of Asian pear during cold storage. *Journal Food Agriculture Environmental*, 2:157-159.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrient of Higher Plants*, 2nd edn. Academic Press, New York.
- Martyn A., Thomas Ch., O'Neill M., Offord C., McConchie, R. 2007. Bract browning in waratahs (*Telopea* spp.) is not a localized calcium deficiency disorder *Scientia Horticulturae*, 112: 434-438.
- Martyn A, Gollnow B., McConchie R., Offord C. 2007. Characterisation of bract browning and the effect of shade on browning in waratah (*Telopea* spp., Proteaceae) cultivars 'Fire and Brimstone', 'Olympic Flame' and 'Wirrimbirra White'. *Scientia Horticulturae*, 112: 427-433.
- Mol J, Jenkins G, Schafer E, Weiss D. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Review Plant Science* 15: 525-557.
- Möller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular. Biology*, 52: 561-591.

- Mizuta, D.; Ban, T.; Miyajima, I.; Nakatsuka, A.; Kobayashi, N. 2009. Comparison of flower color with anthocyanin composition patterns in evergreen azalea. *Scientia Horticulturae*, 122: 594-602.
- Mortensen, L; Ottosen, O.; and Gislerod, H. 2001. Effects of air humidity and K:Ca ratio on growth, morphology, flowering and keeping quality of pot roses *Scientia Horticulturae*, 90 (29):131-141.
- Mühling, K.; Wimmer, M. And Goldbach, H. 1998. Apoplastic and membrane-associated Ca²⁺ in leaves and root as affected by boron deficiency. *Physiologia Plantarum*, 102: 179-184.
- O'Neill S, K S Gould. 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biol*, 30: 865-873.
- Palzkill, D.A., Tibbitts, T.W., Struckmeyer, B.E., 1980. High relative humidity promotes tipburn on young cabbage plants. *Horticulture Science*, 15: 659-660.
- Papadakis, I.; Dimassi, K.; Bosabalidis, A.; Therios, I.; Patakas, A.; Giannakoula, A. 2004. Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Science*, 166:539-547.
- Pfeffer, H.; Dannel, F. And Römheld, V. 2001. Boron compartmentation in root sunflower: A study using the stable isotopes ¹⁰B and ¹¹B adopting two independent approaches. *Physiologia Plantarum*, 113: 346-351.
- Pilbeam and Morley. Calcium. 2007. En: *Handbook of Plant Nutrition*. Edited by Barker D. Taylor and Francis Group.
- Pinter, J., Kósa, E.; Hadi, G.; Hégyi, Z.; Spitzko, T., Toth, Z.; Szigeti, Z.; Paldi, E., Marton, C. 2007. Effect of increased UV- radiation on the anthocyanin content of maize (*Zea mays* L) leaves. *Acta Agronomica Hungarica*, 55(1):7-17.
- Quintana A., Jana Albrechtova J., Griesbach R., Freyre, F. 2007. Anatomical and biochemical studies of anthocyanidins in flowers of *Anagallis monelli* L. (*Primulaceae*) hybrids. *Scientia Horticulturae*, 112: 413-421.
- Rahman, M and Punja, Z. 2007. Mineral nutrition and plant disease. Edited by Datnoff., Elmer W., and Huber. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A.
- Reuter, D and Robinson, J. 1986. *Plant Analysis: An Interpretation Manual*. Inkata Press.

- Ruiz, J.; Bretones, G.; Baghour, M; Ragala, L.; Belakbir, A. And Romero, L. 1998. Relationship between boron and fenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry*, 48(2): 269-272.
- Särkkä , L. 2004. Yield, quality and vase life of cut roses in year-round greenhouse production. Thesis PhD. University of Helsinki. Department of Applied Biology Publication N. 23.
- Saure, M. 1998. Causes of the tipburn disorder in leaves of vegetables. *Scientia Horticulturae*, 76:131-147.
- Saure, M. 2001. Blossom– end rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a calcium – or a stress- related disorder? *Scientia Horticulturae*, 90:193-208.
- Schmitzer V. Osterc. G. Veberic, R . Stampar, F. 2009. Correlation between chromaticity values and major anthocyanins in seven *Acer palmatum* Thunb. cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119: 442-446.
- Sheng, O.; Shangwei, S.; Peng, S.; Deng, X. 2009. The effects of low boron on growth, gas exchange, boron concentration and distribution of ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) plants grafted on two rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 121: 278-283.
- Shear, C.B. (editor). 1979. International symposium on calcium nutrition of economic crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 10 (1 y 2):1-502.
- Singh, A., Selvi, M. T., Sharma, R. 1999. Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *Journal Experimental Botany*, 50: 1619-1628.
- Singh, R.; Sharma, R.; Tyagi, S. 2007. Pre-harvest foliar application of calcium and boron influences physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry. (*Fragaria ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 112: 215-220.
- Stangoulis, J and Graham R. 2007. Mineral nutrition and plant disease. Edited by Datnoff., Elmer W., and Huber. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A.
- Stilesa, E.; Cecha, B.; Deea, M.; Laceyb, E. 2007. Temperature-sensitive anthocyanin production in flowers of *Plantago lanceolata*. *Physiologia Plantarum*, 129: 756-765.
- Sylwester Smolen S., Sady W. 2009. The effect of various nitrogen fertilization and foliar nutrition regimes on the concentrations of sugars, carotenoids and phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.). *Scientia Horticulturae*, 120: 315-324.

- Taiz L., and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology. Third Edition, Sinauer Associate, Inc. Unite State of America. 690 p.
- Tanaka, Y.; Sasaki, N.; Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54:733- 749.
- Torre, S., A. Borochoy, and A.H. Halevy. 1999. Calcium regulation of senescence in rose petals. *Physiologia. Plantarum*, 107:214-219.
- Torre, T. Fjeld and H. Gislerød. 2001. Effects of air humidity and K/Ca ratio in the nutrient supply on growth and postharvest characteristics of cut roses. *Scientia Horticulturae*, 90, (16)291-304.
- Wissemeier, A.H., 1993. Marginal bract necrosis in Poinsettia cultivars and the relationship to bract calcium nutrition. *Gartenbauwissenschaft* 58: 158-163.
- Xuan, H., Streif, J., Pfeffer, H., Dannel, F., Romheld, V., Bangerth, F. 2001. Effect of pre-harvest boron application on the incidence of storage related disorders in Conference pears. *Journal Horticulture Science Biotechnology*, 76: 133-137.
- Wei, Zh...; Furusaki, Sh.; Franco, Ch. 1999. A two-stage process with temperature-shift for enhanced anthocyanin production in strawberry cell suspension cultures. *Science in China*, 42(4).
- Weiss, D. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiologia Plantarum*, 110: 152-157.
- Weiss D, Halevy AH. 1989. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in *Petunia hybrida*. *Planta*, 179: 89-96.
- Whittaker, A.; Vazzana, C.; Vecchio, V.; Benedettelli, S. 2009. Evaluation of direct and indirect effects of flavonoids, mineral elements and dry weight on antiradical scavenging activity in leaf material of field-grown *Trifolium pratense* cultivars using Path Analysis. *Field Crops Research*, 113:1- 11.
- Wrolstad, R.E. 2001. Extraction, Isolation and Purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Copyright. by John Willey and Sons. Inc.
- Wyszecki, G.; Stiles, W.S. (1982). *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc, New York. p. 117-248.

- Zhang, J.; Wang, L.; Qingyan, S.; Zheng an, L.; Li, Chonghui.; Wei, Z., Tian, D. 2007. Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony, *Scientia Horticulturae*, 114:104-111.
- Zhang,J.; Liang-Sheng Wang L, Jin-Ming Gao, Qing-Yan Shu, Chong-Hui Li, Juan Ya, Qing Ha and Jing-Jing Zhang. 2008. Determination of Anthocyanins and Exploration of Relationship between Their Composition and Petal Coloration in Crape Myrtle (*Lagerstroemia* hybrid). *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (5): 581-588.