



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN EDAFOLOGÍA

**RESPUESTAS AGRONÓMICAS, FISIOLÓGICAS Y DE CALIDAD
DE *Tagetes erecta* A FACTORES AMBIENTALES**

MARÍA GUADALUPE PERALTA SÁNCHEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis, titulada: **Respuestas agronómicas, fisiológicas y de calidad de *Tagetes erecta*, a factores ambientales** realizada por la alumna **María Guadalupe Peralta Sánchez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

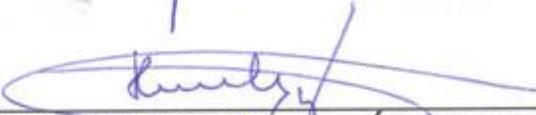
**DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: 
DRA. LIBIA IRIS TREJO-TÉLLEZ

ASESORA: 
DRA. MARÍA DE LAS NIEVES RODRÍGUEZ MENDOZA

ASESOR: 
DR. MIGUEL ANGEL SERRATO CRUZ

ASESOR: 
DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR: 
DR. J. CRUZ GARCÍA ALBARADO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2015

RESPUESTAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS Y DE CALIDAD DE *Tagetes erecta* A ESTÍMULOS AMBIENTALES

María Guadalupe Peralta Sánchez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Factores o estímulos de naturaleza abiótica como salinidad, deficiencia o exceso de nutrimentos, y luz, entre otros, pueden afectar el metabolismo secundario en plantas. En esta investigación se realizaron cuatro experimentos con el objetivo de evaluar las respuestas morfológicas, fisiológicas y de calidad de *Tagetes erecta* var. Inca a diferentes estímulos ambientales en invernadero, usando como sustrato inerte una mezcla tezontle y perlita (60:40, v:v), y las plantas fueron irrigadas mediante un sistema de riego por goteo. Los tratamientos fueron aplicados al inicio de la floración. En el primer experimento se trataron plántulas con dos concentraciones de NaCl (10 y 47 mM), y se pudo observar que el suministro de esta sal en la solución nutritiva a una concentración de 10 mM incrementa la biomasa seca en todos los órganos de la planta, así como la concentración y acumulación de K⁺ en hojas y flores, carotenoides totales, flavonoides, aminoácidos libres totales y proteínas solubles totales, y aceites esenciales, predominando ocimeno y limoneno en hojas, y piperitona en flores. Con 47 mM de NaCl incrementa la acumulación y concentración de Na⁺ en raíces, y con ambas concentraciones salinas incrementa el farneseno en raíces y cariofileno en tallos. En el segundo experimento se evaluaron cuatro porcentajes de sombreado (0, 30, 50 y 70 %), y se pudo apreciar que con 30 % de sombreado, incremento la biomasa seca en todos los órganos de la planta, así como el contenido del aceite esencial cariofileno en flores y clorofilas en hojas. Con 50 % de sombreado se incrementaron carotenoides totales en tallos, así como piperitona, azúcares totales en hojas y aminoácidos libres totales en flores. En el tratamiento testigo (0 % de sombreado) incrementó la concentración de flavonoides totales, piperitona y aminoácidos libres totales en hojas, y β-farneseno en raíces. En el tercer experimento se evaluaron cuatro niveles de nitrógeno (0, 4.2, 8.4 y 12.6 mg L⁻¹), y se pudo observar que la aplicación de 12.6 mg L⁻¹ de N incrementa la biomasa seca total en todos los órganos de la planta, así como la concentración de N en hojas y tallos, mayor acumulación de N en hojas, flores y tallos y las clorofilas también se elevaron. Con dosis de 8.4 mg L⁻¹ aumentó la concentración de N en flores, la piperitona en flores y aminoácidos libres totales en hojas. Con 4.2 mg L⁻¹ se registró un efecto positivo en flavonoides totales, incremento en D-limoneno y Trans-ocimeno en hojas, en tallos piperitona y β-farneseno, mayor concentración de aminoácidos libres totales en flores y proteínas solubles totales en hojas. En el cuarto experimento, se evaluaron tres concentraciones de N (8.47, 12.71 y 16.94 mg L⁻¹ y dos porcentajes de sombreado (0 y 70 %), observándose que por efecto principal de N con dosis de 16.94 mg L⁻¹ N en la solución nutritiva se incrementan carotenoides totales, y aminoácidos libres totales en hojas y flores. Con dosis de 8.47 mg L⁻¹ de N se incrementan flavonoides totales en flores. Por efecto principal de sombreado al 70 % aumentaron los carotenoides totales y flavonoides totales en flores, aminoácidos libres totales en hojas, en tanto que el tratamiento testigo sin sombreado incrementó aminoácidos libres totales en flores y proteínas solubles totales en hojas y flores. Por efecto de la interacción de los factores de estudio incrementaron carotenoides totales y aminoácidos libres totales en hojas con dosis de 16.94 mg L⁻¹ al 70 %, y flores con la misma dosis sin sombreado. Los aceites esenciales fueron variables, predominando D-limoneno y ocimeno en hojas, trans-pineno en flores, piperitona en tallos y β-farneseno en raíces.

Palabras clave: Asteraceae, sombreado, salinidad, nitrógeno, estrés abiótico.

MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND QUALITY RESPONSES OF *Tagetes erecta* TO ENVIRONMENTAL STIMULI

María Guadalupe Peralta Sánchez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Factors or stimuli of abiotic nature such as salinity, nutrient deficiency or excess, and light, among others, may affect the secondary metabolism in plants. In this study we carried out four experiments aimed to evaluate morphological, physiological and quality responses of *Tagetes erecta* var. Inca to different environmental stimuli, under greenhouse conditions, using a mixture of tezontle and perlite (60:40, v:v) as an inert substrate, and a drop-irrigation system to water plants. All treatments were applied in the beginning of the flowering stage. In the first experiment we tested two NaCl concentrations (10 y 47 mM), and observed that the application of 10 mM NaCl to the nutrient solution resulted in significant increases in dry-biomass weight of all plant tissues, as well as concentration and accumulation of K⁺ in leaves and flowers, total carotenoid, flavonoids, total free amino acids, total protein contents, and essential oils, especially ocimene and limonene in leaves, and piperitone in flowers. With 47 mM NaCl we observed increases in concentration and accumulation of Na⁺ in roots, and with both salt concentrations, the farnesene in roots, and the caryophyllene in stems were augmented. In the second experiment, four shadow treatments were evaluated: 0, 30, 50 y 70 %. By using 30 % shadow, evident increases in dry biomass weight in all plant tissues as well as in the content of essential oils caryophyllene in flowers and chlorophylls in leaves were observed. With 50 % shadow we observed significant increases in total carotenoids, as well as in piperitone, total sugars, and total free amino acids in flowers. In the control (0 % shadow) the concentration of total flavonoids, piperitone and total free amino acids in leaves and β-farnesene in roots were observed. In the third experiment four levels of N (0, 4.2, 8.4 and 12.6 mg L⁻¹) in the nutrient solution were evaluated. We observed that the application of 12.6 mg L⁻¹ N increases the dry biomass weight in all plant tissues, as well as the concentration of N in leaves and stems, accumulation of N in leaves, flowers and stems, and chlorophylls in leaves. By applying 8.4 mg L⁻¹ N an increase in N concentration in leaves, piperitone in flowers and total free amino acids in leaves were observed. The treatment of 4.2 mg L⁻¹ N increased total flavonoids, D-limonene and trans-ocimene in leaves, piperitone and β-farnesene in stems, total free amino acids in flowers and total soluble proteins in leaves. In the fourth experiment, three N concentrations (8.47, 12.71 and 16.94 mg L⁻¹), and two shadow levels (0 and 70 %), were evaluated. The application of 16.94 mg L⁻¹ N in the nutrient solution increased total carotenoids, as well as total free amino acids in flowers and leaves, while the application of 8.47 mg L⁻¹ N increased total flavonoids in flowers. The 70 % shadow positively affected total carotenoids and total flavonoids in flowers, free amino acids in leaves, while control plants without shadow augmented total free amino acids in flowers, and total soluble proteins in leaves and flowers. Interaction of these study factors (N and shadow) increased total carotenoids and total free amino acids when applying 16.94 mg L⁻¹ at 70 %, in leaves, and in flowers with the same dosage of N but without shadow. Essential oils varied, being more predominant D-limonene and ocimene in leaves, trans-pinene in flowers, piperitone in stems, and β-farnesene in roots.

Keywords: Asteraceae, shadow, salinity, nitrogen, abiotic stress.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre en mi camino y sobretodo porque escucha mis oraciones en los momentos difíciles y agradables de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados en especial al programa de Edafología, por el apoyo otorgado para llevar a cabo mis estudios de Doctorado.

A la Línea Prioritaria de Investigación 4 Agronegocios, Agroecoturismo y Arquitectura del Paisaje del Colegio de Postgraduados ya la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento Nutrición Vegetal para el Desarrollo Sustentable del Postgrado en Edafología, por los apoyos brindados para llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Libia Iris Trejo Téllez por la dirección, por su amistad, paciencia, disponibilidad, responsabilidad y sobre todo por ser un gran ser humano no tengo palabras con que agradecerle infinitamente.

A la Dra. María de las Nieves Rodríguez Mendoza por sus valiosas observaciones y aportaciones durante la realización de la investigación.

Al Dr. Fernando Carlos Gómez Merino por sus acertadas aportaciones durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz por sus comentarios y observaciones durante la culminación de este trabajo.

Al Dr. J. Cruz García Albarado gracias por las aportaciones brindadas y apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr. Marcos Soto Hernández por las facilidades otorgadas en el laboratorio de Fitoquímica, a la Dra. Mariana Palma y al Sr. Domingo por su ayuda brindada.

Al M.C. Ricardo Torres Castro por su dedicación y paciencia en el uso del cromatógrafo de gases.

Al equipo del laboratorio de Nutrición Vegetal por las facilidades otorgadas durante mi estancia en el Colegio.

A la secretaría Laurita, al Sr. Juanito por su amistad y ayuda.

DEDICATORIA

A mis padres Candelaria y José Guadalupe, gracias por enseñarme el camino del bien, por sus consejos, por hacerme una hija responsable y luchar por lo que quiero.

A mi esposo Pablo, por su apoyo incondicional y paciencia.

A mis hijos Aylín Suzet y Pável, por ser mis motores para seguir adelante cuando sentía que ya no podía ustedes me alentaron con una sonrisa, los quiero y los amo.

A mis hermanas y hermano Mica, Maru, Jose, Lucio, Maty y Raquel, por el cariño brindado y amor incondicional.

A mis sobrinos y sobrinas Yessica, Ivonne, Alberto, Trini, Mari, Gabriel, Dafne, Arturo, Adriana, Adrián, Britany y Luis.

A mis compañeros y amigos que han formado parte de mi vida en especial a Ariadna, Emmanuel, Nadia, Leonel, Hermes, César, Elías, Edgar gracias por compartir los mejores momentos y que hicieron de mi estancia una agradable experiencia... y todos los demás que me faltaron.

A mis amigas de la Universidad en especial a Yeni, Brenda, Mayer, Mayeli gracias por seguir en comunicación.

A mis profesores que apoyaron en mi formación académica.

Sinceramente.....
Lupita Peralta

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Caracterización botánica del cempasúchil	1
Importancia económica y producción de cempasúchil en México	1
Usos del género <i>Tagetes</i>	3
Metabolitos con actividad biocida	4
Usos medicinales y farmacológicos	4
Uso de pigmentos en la industria alimenticia	6
Composición química del género <i>Tagetes</i>	6
Factores abióticos que modifican la producción y composición de metabolitos primarios y secundarios	10
Salinidad	11
Luminosidad	13
Nutrición del cultivo	17
Conclusiones de la revisión de literatura y justificación general de la investigación	21
Literatura citada	22
CAPÍTULO I. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y NUTRIMENTALES DE <i>Tagetes erecta</i> Linn. A CONDICIONES DE SALINIDAD	27
1.1. INTRODUCCIÓN	27
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
1.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal	30
1.2.2. Manejo del experimento	31
1.2.3. Tratamientos evaluados	31
1.2.4. Diseño experimental	31
1.2.5. Variables evaluadas	32
1.2.5.1. Biomasa seca y concentración nutrimental	32
1.2.5.2. Acumulación nutrimental	32
1.2.5.3. Carotenoides totales en flores	32
1.2.5.4. Flavonoides totales	33
1.2.5.5. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	34
1.2.5.6. Clorofilas a, b y totales	34
1.2.5.7. Azúcares totales en hojas y flores	35
1.2.5.8. Aminoácidos libres totales	35
1.2.5.9. Proteínas solubles totales	36
1.2.6. Análisis de resultados	36
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
1.3.1. Biomasa seca	36
1.3.2. Concentración y acumulación de cationes (K, Ca y Mg) y de Na	37
1.3.3. Carotenoides totales en flores	47

1.3.4. Flavonoides totales en flores.....	48
1.3.5. Aceites esenciales por órganos.....	49
1.3.6. Concentración de clorofilas	53
1.3.7. Azúcares totales en hojas y flores.....	54
1.3.8. Aminoácidos libres totales en hojas y flores	56
1.3.9. Proteínas solubles totales en hojas y flores.....	57
1.4 CONCLUSIONES	60
1.5 LITERATURA CITADA.....	60
CAPÍTULO II. RESPUESTAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS Y DE CALIDAD EN CEMPASÚCHIL (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) BAJO ESTRÉS DE LUMINOSIDAD	64
2.1. INTRODUCCIÓN	64
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	67
2.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal.....	67
2.2.2. Manejo del experimento	67
2.2.3. Tratamientos evaluados	68
2.2.4. Diseño experimental	68
2.2.5. Variables evaluadas.....	68
2.2.5.1. Altura de rama lateral	70
2.2.5.2. Número de ramas primarias	70
2.2.5.3. Número de botones cerrados	70
2.2.5.4. Número de botones semiabiertos.....	70
2.2.5.5. Número de botones abiertos	70
2.2.5.6. Diámetro de cabezuelas	70
2.2.5.7. Biomasa seca y concentración nutrimental.....	70
2.2.5.8. Carotenoides totales en flores	71
2.2.5.9. Flavonoides totales	72
2.2.5.10. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	72
2.2.5.11. Clorofilas a, b y totales	73
2.2.5.12. Azúcares totales en hojas y flores	74
2.2.5.13. Aminoácidos libres totales en hojas y flores	74
2.2.5.14. Proteínas solubles totales en hojas y flores.....	75
2.2.6. Análisis de resultados	75
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
2.3.1. Variables morfológicas.....	76
2.3.2. Variables fisiológicas.....	79
2.3.2.1. Biomasa seca.....	79
2.3.2.2. Concentración nutrimental.....	81
2.3.2.3. Carotenoides totales en flores	82
2.3.2.4. Flavonoides totales en flores	84
2.3.2.5. Aceites esenciales por órganos.....	85
2.3.2.6. Concentración de clorofilas	90
2.3.2.7. Azúcares totales en hojas y flores	91
2.3.2.8. Aminoácidos libres totales en hojas y flores	93
2.3.2.9. Proteínas solubles totales en hojas y flores.....	95
2.4. CONCLUSIONES	96
2.5. LITERATURA CITADA.....	97

CAPÍTULO III. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS, MORFOLÓGICAS, Y DE CALIDAD DE <i>Tagetes erecta</i> Linn., A LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA.....	101
3.1. INTRODUCCIÓN	101
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	104
3.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal.....	104
3.2.2. Manejo del experimento	105
3.2.3. Tratamientos evaluados	105
3.2.4. Diseño experimental	105
3.2.5. Variables morfológicas	106
3.2.5.1. Número de ramas primarias	106
3.2.5.2. Longitud de ramas primarias	106
3.2.5.3. Número de ramas secundarias.....	106
3.2.5.4. Longitud de ramas secundarias.....	106
3.2.5.5. Número de botones cerrados	106
3.2.5.6. Número de cabezuelas abiertas	106
3.2.5.7. Diámetro de cabezuelas	106
3.2.5.8. Color	106
3.2.6. Variables fisiológicas.....	107
3.2.6.1. Biomasa seca y concentración nutrimental.....	107
3.2.6.2. Acumulación nutrimental	108
3.2.6.3. Carotenoides totales en flores	108
3.2.6.4. Fenoles totales	109
3.2.6.5. Flavonoides totales	109
3.2.6.6. Actividad antioxidante.....	110
3.2.6.7. Rendimiento de aceites esenciales	110
3.2.6.8. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	111
3.2.6.9. Clorofilas a, b y totales	112
3.2.6.10. Azúcares totales en hojas y flores	112
3.2.6.11. Aminoácidos libres totales en hojas y flores	113
3.2.6.12. Proteínas solubles totales en hojas y flores	113
3.2.7. Análisis de resultados	113
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	114
3.3.1. Variables morfológicas	114
3.3.2. Color (Luminosidad, Hue y Croma)	118
3.3.3. Variables fisiológicas.....	120
3.3.3.1. Biomasa seca.....	120
3.3.3.2. Concentración y acumulación de macronutrientos (N, P, K, Ca, Mg y S)	122
3.3.3.3. Carotenoides totales en flores	137
3.3.3.4. Fenoles totales en hoja y flor.....	138
3.3.3.5. Flavonoides totales en hoja y flor	140
3.3.3.6. Actividad antioxidante en hoja y flor	142
3.3.3.7. Rendimiento de aceites esenciales en hoja y flor	143
3.3.3.8. Composición de aceites esenciales por órgano.....	145
3.3.3.9. Concentración de clorofilas	153
3.3.3.10. Azúcares totales en hojas y flores	154
3.3.3.11. Aminoácidos libres totales en hojas y flores	157
3.3.3.12. Proteínas solubles totales en hojas y flores	158

3.4. CONCLUSIONES	160
3.5. LITERATURA CITADA.....	161
CAPÍTULO IV. INTENSIDAD LUMINOSA Y LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y DE CALIDAD DE <i>Tagetes erecta</i> Linn.....	166
4.1. INTRODUCCIÓN	166
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	168
4.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal.....	168
4.2.2. Manejo del experimento	169
4.2.3. Diseño de tratamientos	169
4.2.4. Diseño experimental	170
4.2.5. Variables evaluadas.....	171
4.2.5.1. Altura de rama lateral	171
4.2.5.2. Número de ramas primarias	171
4.2.5.3. Número de ramas secundarias.....	171
4.2.5.4. Número de botones cerrados	171
4.2.5.5. Número de botones semiabiertos.....	171
4.2.5.6. Número de cabezuelas abiertas	171
4.2.5.7. Diámetro de cabezuelas.....	172
4.2.5.8. Biomasa seca y concentración nutrimental.....	172
4.2.5.9. Carotenoides totales en flores	172
4.2.5.10. Flavonoides totales.....	173
4.2.5.11. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	174
4.2.5.12. Clorofilas a, b y totales	174
4.2.5.13. Azúcares totales en hojas y flores	175
4.2.5.14. Aminoácidos libres totales en hojas y flores	175
4.2.5.15. Proteínas solubles totales en hojas y flores.....	176
4.2.8. Análisis de resultados	176
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	177
4.3.1. Variables morfológicas.....	177
4.3.1.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	177
4.3.1.2. Efecto principal del factor sombreado.....	180
4.3.1.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado).....	183
4.3.2. Biomasa seca por órganos.....	188
4.3.2.1. Efecto principal del nitrógeno	188
4.3.2.2. Efecto principal del sombreado	189
4.3.2.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado).....	192
4.3.3. Concentración nutrimental (N, P, K).....	194
4.3.3.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	194
4.3.3.2. Efecto principal del factor sombreado.....	196
4.3.3.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado).....	197
4.3.4. Carotenoides totales en flores.....	200
4.3.4.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	200
4.3.4.2. Efecto principal del factor sombreado.....	200

4.3.4.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado).....	203
4.3.5. Flavonoides totales en flores.....	204
4.3.5.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	204
4.3.5.2. Efecto principal del factor sombreado.....	204
4.3.5.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno x sombreado).....	206
4.3.6. Aceites esenciales por órganos.....	206
4.3.6.1. Componentes del aceite esencial en hojas.....	208
4.3.6.2. Componentes del aceite esencial en cabezuelas	209
4.3.6.3. Componentes del aceite esencial en tallos.....	210
4.3.6.4. Componentes del aceite esencial en raíces	211
4.3.7. Concentración de clorofilas	211
4.3.7.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	211
4.3.7.2. Efecto principal del factor sombreado.....	212
4.3.7.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno x sombreado).....	213
4.3.8. Azúcares totales en hojas y flores.....	214
4.3.8.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	214
4.3.8.2. Efecto principal del factor sombreado.....	216
4.3.8.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado).....	217
4.3.9. Aminoácidos libres totales en hojas y flores	218
4.3.9.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	218
4.3.9.2. Efecto principal del sombreado	221
4.3.9.10. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado).....	222
4.3.10. Proteínas solubles totales en hojas y flores.....	224
4.3.10.1. Efecto principal del factor nitrógeno.....	224
4.3.10.2. Efecto principal del factor sombreado.....	225
4.3.10.3. Efecto de la interacción de factores de estudio (nitrógeno X sombreado).....	226
4.4. CONCLUSIONES	227
4.5. LITERATURA CITADA.....	229

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1 Principales compuestos de aceites esenciales (%), de especies diferentes de <i>Tagetes</i>	8
Cuadro 2 Principales compuestos de aceites esenciales (%) de <i>Tagetes erecta</i>	9
Cuadro 1.1 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con dos niveles de NaCl.	50
Cuadro 1.2 Concentraciones foliares de clorofilas bajo dos niveles de NaCl.	54
Cuadro 2.1 Temperaturas máxima, mínima y media en °C, registradas en el invernadero con los cuatro porcentajes de sombreado evaluados en el año 2012.	69
Cuadro 2.2 Humedades relativas máxima, mínima y media en porcentaje, registradas en el invernadero con los cuatro porcentajes de sombreado evaluados en el año 2012.	69
Cuadro 2.3 Intensidades luminosas máxima, mínima y media en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, registradas en el invernadero con los cuatro porcentajes de sombreado evaluados en el año 2012.	69
Cuadro 2.4 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes porcentajes de sombreado.	76
Cuadro 2.5 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes porcentajes de sombreado.	77
Cuadro 2.6 Significancia estadística del porcentaje de sombreado durante 80 días sobre variables de crecimiento y morfológicas en cempasúchil.	78
Cuadro 2.7 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes porcentajes de sombreado.	82
Cuadro 2.8 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes porcentajes de sombreado.	86
Cuadro 3.1 Parámetros morfológicos en plantas de cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la fase de floración.	114
Cuadro 3.2 Parámetros morfológicos en plantas de cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la fase de floración.	115
Cuadro 3.3 Parámetros morfológicos en plantas de cempasúchil después de 45 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la fase de floración.	117
Cuadro 3.4 Parámetros de color en hojas de plantas de cempasúchil tratadas durante 30 días en la fase de plena floración, con distintas dosis de N en la solución nutritiva. ...	119
Cuadro 3.5 Parámetros de color en flores de plantas de cempasúchil tratadas durante 30 días en la fase de plena floración, con distintas dosis de N en la solución nutritiva. ...	120
Cuadro 3.6 Actividad antioxidante en hojas de cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva.	142
Cuadro 3.7 Actividad antioxidante en flores de cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno.	142
Cuadro 3.8 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes niveles de nitrógeno.	146

Cuadro 4.1 Temperaturas, humedades relativas e intensidades luminosas máxima, mínima y media en ($^{\circ}$ C, % y $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente) registradas en el invernadero durante esta fase de investigación.....	170
Cuadro 4.2 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva en fase de floración.....	177
Cuadro 4.3 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva en fase de floración.....	179
Cuadro 4.4 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 80 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva en fase de floración.....	179
Cuadro 4.5 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.	180
Cuadro 4.6 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.	182
Cuadro 4.7 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 80 días de tratamiento con dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.	182
Cuadro 4.8 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva y dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.....	185
Cuadro 4.9 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado.	186
Cuadro 4.10 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 80 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado. ...	187
Cuadro 4.11 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva durante la fase de floración.	195
Cuadro 4.12 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes niveles de sombreado. ...	196
Cuadro 4.13 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva y porcentajes de sombreado durante la fase de floración.	199
Cuadro 4.14 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración...207	
Cuadro 4.15 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en hojas de plantas de <i>Tagetes erecta</i> var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la floración.	208
Cuadro 4.16 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en flores de plantas de <i>Tagetes erecta</i> var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración...210	
Cuadro 4.17 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en tallos de plantas de <i>Tagetes erecta</i> var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración...210	
Cuadro 4.18 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en raíces de plantas de <i>Tagetes erecta</i> var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración...211	

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1.1 Material vegetal utilizado, plántulas de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn var. Inca).....	30
Figura 1.2 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de riego con solución nutritiva y dos concentraciones de NaCl. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	37
Figura 1.3 Concentración (A) y acumulación (B) de potasio en flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	38
Figura 1.4 Concentración (A) y acumulación (B) de calcio en flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	40
Figura 1.5 Concentración (A) y acumulación (B) de magnesio en flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	41
Figura 1.6 Concentración (A) y acumulación (B) de sodio en flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	42
Figura 1.7 Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. m.s.=materia seca.	48
Figura 1.8 Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. m.s.=materia seca.	49
Figura 1.9 Aceites esenciales identificados en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración.	52
Figura 1.10 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	55
Figura 1.11 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	56

Figura 1.12 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	58
Figura 2.1 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con cuatro porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.....	80
Figura 2.2 Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.	83
Figura 2.3 Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS=peso seco.	85
Figura 2.4 Aceites esenciales identificados en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración.	87
Figura 2.5 Aceites esenciales identificados en tallos (A) y raíces (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 38 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración.	90
Figura 2.6 Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.....	91
Figura 2.7 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración por 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.....	93
Figura 2.8 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 40 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	94
Figura 2.9 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	95
Figura 3.1 Material vegetal, plántulas de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) var. Inca y establecimiento del experimento en invernadero.	104
Figura 3.2 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con cuatro niveles de N en la solución nutritiva. Medias \pm desviación estándar, con	

	letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	120
Figura 3.3	Concentración de nitrógeno en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de planta de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	123
Figura 3.4	Acumulación de nitrógeno en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de cempasúchil tratado con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	124
Figura 3.5	Concentración de fósforo en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	125
Figura 3.6	Acumulación de fósforo en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	126
Figura 3.7	Concentración de potasio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	128
Figura 3.8	Acumulación de potasio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	129
Figura 3.9	Concentración de calcio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	130
Figura 3.10	Acumulación de calcio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	131
Figura 3.11	Concentración de magnesio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	132
Figura 3.12	Acumulación de magnesio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	133
Figura 3.13	Concentración de azufre en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	134
Figura 3.14	Acumulación de azufre en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución	

	nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).	135
Figura 3.15	Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 36 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.	138
Figura 3.16	Fenoles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 30 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	139
Figura 3.17	Flavonoides totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 30 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	141
Figura 3.18	Rendimiento de aceites en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	144
Figura 3.19	Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de hojas de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).	148
Figura 3.20	Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de cabezuelas de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).	150
Figura 3.21	Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de tallos de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).	151
Figura 3.22	Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de raíces de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).	152
Figura 3.23	Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 30 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	154
Figura 3.24	Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 30 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	156
Figura 3.25	Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 30 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable,	

	indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.....	158
Figura 3.26	Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 30 días con diferentes niveles de nitrógeno en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	159
Figura 4.1	Material vegetal, plántulas de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) y establecimiento del experimento.....	168
Figura 4.2	Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con tres niveles de N en la solución nutritiva. Medias \pm desviación estándar, con la misma letra en cada órgano indican que no existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	188
Figura 4.3	Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con dos porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.....	190
Figura 4.4	Biomasa seca de flores (A) y hojas (B) de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con tres niveles de N en la solución nutritiva y dos porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	192
Figura 4.5	Biomasa seca de tallos (A) y raíces (B) de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con tres niveles de N en la solución nutritiva y dos porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.	193
Figura 4.6	Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva (A) y dos porcentajes de sombreado (B) en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.	202
Figura 4.7	Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva (A) y dos porcentajes de sombreado (B) en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.	203
Figura 4.8	Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 38 días con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva (A) y dos porcentajes de sombreado (B) en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.	205
Figura 4.9	Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 38 días con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva en interacción con dos porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS=peso seco.	206

Figura 4.10	Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	212
Figura 4.11	Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	213
Figura 4.12	Concentración foliar de clorofila a (A) y clorofila b (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	214
Figura 4.13	Concentración foliar de clorofila total de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	214
Figura 4.14	Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	216
Figura 4.15	Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	217
Figura 4.16	Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	218
Figura 4.17	Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	220
Figura 4.18	Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	222
Figura 4.19	Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	223
Figura 4.20	Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes niveles de nitrógeno en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada	

	subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	224
Figura 4.21	Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con dos porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	225
Figura 4.22	Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.	227

INTRODUCCIÓN GENERAL

Caracterización botánica del cempasúchil

El cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) pertenece a la Asteraceae o Compositae, una de las más distribuidas en el mundo, aunque su mayor diversidad se encuentra en el continente americano. México es un centro de origen y diversidad genética de muchas de las tribus que conforman esta familia. Ubicado en la tribu *Tagetae*, el género *Tagetes* se compone de 58 especies (Serrato-Cruz, 2010).

Serrato-Cruz (2006) indica que *Tagetes erecta* Linn., es una planta herbácea anual muy aromática, erecta, con tallos estriados y hojas pinnadas. Su flor es una cabezuela solitaria, considera una inflorescencia dado que contiene numerosas flores individuales tubuladas y liguladas. La morfología de la inflorescencia puede corresponder a cuatro modalidades: 1) tipo pompón y doble, en este caso la inflorescencia está constituida exclusivamente por flores individuales liguladas; 2) tipo sencillo o margarita, posee tanto flores liguladas como tubuladas; éstas últimas en el disco central, mientras que las liguladas en la zona periférica (Chi *et al.*, 2002); 3) tipo semidoble, en las cuales hay varias hileras de flores liguladas en la zona radial del capítulo y del tipo tubulado en el disco floral (Gupta *et al.*, 1999; Serrato-Cruz, 2006) y 4) tipo apétalo en el que las flores individuales son androestériles, es decir, son flores femeninas pistiladas, ninguna con lígulas.

Importancia económica y producción de cempasúchil en México

En la República Mexicana los estados líderes en la producción de cempasúchil (*T. erecta*) son Puebla, Estado de México, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, San Luis Potosí, Morelos y Tlaxcala; así en el 2013, el Distrito Federal registró una producción de 19 millones de plantas en invernadero y cielo abierto, con una valor de producción de 235

millones de pesos (Tierrafertil, 2014). El 69.2 % de la superficie cultivada se encuentra en el estado de Puebla, mientras que en el Estado de México, Oaxaca, Guerrero e Hidalgo se ubica el 10, 5.2, 3.7 y 2.6 %, respectivamente (SAGARPA, 2011). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reporta que durante 2011 se produjeron 9 mil 385 Mg de esta flor, 434 mil 940 manojos y un millón 50 mil plantas para el día de muertos (SAGARPA, 2012).

Esta especie, *T. erecta*, también crece en forma silvestre en varios estados del país entre los que se cuentan San Luis Potosí, Chiapas, Estado de México, Puebla, Sinaloa, Veracruz, Guerrero y Tlaxcala) (Ecoosfera, 2013).

Puebla es el principal productor de cempasúchil a nivel nacional con una producción de 10,000 Mg, con valor de producción superior a los 15 millones de pesos y más de 2,300 familias beneficiadas (Torres, 2014; Vizcarra, 2014). Los municipios poblanos en los que se cultiva son Atlixco, Tianguismanalco, Palmar de Bravo, Santa Isabel, Cholula, Huaquechula, San Jerónimo Tecuanipan, Quecholac, Tepeaca, Acatzingo, Tehuacán y Huejotzingo; en una superficie de 211 ha (DiarioECO, 2014). Entre los municipios, destaca Atlixco, dado que su producción representa el 30 % del total de la cosecha poblana de la flor y alcanzan rendimientos de hasta 11.3 Mg ha⁻¹ (Vega, 2013).

Por otro lado, en la delegación Xochimilco del Distrito Federal, la venta de esta planta en maceta durante la festividad de Día de Muertos va de 8 a 15 pesos. Actualmente también se cultiva a cielo abierto en la delegación Tláhuac, también en el Distrito Federal, principalmente como flor de corte que se vende en manojos. En el 2014, los floricultores del Distrito Federal obtuvieron ganancias de 10 millones de pesos por la venta de un millón de plantas de cempasúchil en esta festividad (Tierrafertil, 2014). En el Estado de Morelos en el 2014, se ofrecieron alrededor de 250 toneladas de flor de corte de

cepasúchil y terciopelo denominadas artesanales, y con más de 220 mil plantas en maceta, con un valor de producción de un millón 30 mil pesos (2000Agro, 2014).

A pesar de que México es centro de origen y diversidad genética del ceapasúchil, nuestro país solo aporta el 3 % de la producción mundial para la industria de la pigmentación avícola; mientras que China aportó el 75 %, seguido de la India y Perú con el 20 y 2 %, respectivamente (Torres, 2011).

En el sector avícola en México se consumen 100 millones de xantofila (Informador, 2012). El mercado chino en pigmentación avícola está creciendo, aunque México, Perú y la India aumenten la superficie de cultivo, no son competitivos con China (Torres, 2011).

En México existen empresas dedicadas a la extracción y procesamiento de pigmentos naturales para las industrias avícola y piscícola, así como para uso humano. Por ejemplo, Productos Deshidratados de México (Prodemex) es una empresa privada mexicana localizada en Los Mochis, Sinaloa (2000Agro, 2001). Otra empresa es la industria Alcosa, S.A. de C.V., la cual en 1994 lanzó al mercado pigmentos naturales, tanto líquidos como en polvo con un perfil de xantofilas, elaborando productos altos en zeaxantina conocida como marca registrada PIXAFIL (Industrias ALCOSA, 2014).

Usos del género *Tagetes*

El cultivo y su uso se remontan a épocas prehispánicas. Debido a su olor característico, las plantas de algunas especies se utilizan en la festividad de Día de Muertos (Marotti *et al.*, 2004). Los mexicanos a su paso por el Valle de Malinalco adoptaron esta tradición, con el paso del tiempo transformaron la flor de Tonalxochitl en una flor con más pétalos, un aroma intenso y color resplandeciente (Angelopolita, 2014). También se utiliza como

especie ornamental (flor de corte, jardín y maceta), misma que es cada vez más aceptada en México (Serrato-Cruz, 2004).

Tagetes como fuente de colorante natural (Timberlake y Henry, 1986; Barzana *et al.*, 2002) y otros metabolitos secundarios interesantes como los aceites esenciales (Piccaglia *et al.*, 1996; Vasuvedan *et al.*, 1997) y tiofenos (Hulst *et al.*, 1989).

México cuenta con más de la mitad de las especies del género *Tagetes* distribuidas en América, la mayoría de ellas son aromáticas (Serrato, 2010). El aroma característico en *Tagetes* se atribuye al tipo de metabolitos presentes en el aceite esencial localizado en estructuras especiales en toda la planta (Díaz-Cedillo y Serrato-Cruz, 2011) y en forma abundante en la parte aérea. Las sustancias naturales que posee han contribuido para la revalorización del género. A continuación se mencionan los principales usos.

Metabolitos con actividad biocida

El aceite de *Tagetes* tiene actividad biológica sobre varios organismos patógenos de plantas y animales, así como en humanos, por lo que este género representa una opción en agricultura y medicina como insumo natural con efecto biocida, biorrepelente o biostático (Díaz-Cedillo y Serrato-Cruz, 2011).

Los principales usos del cempasúchil reportados por Serrato y Quijano (1993), son: como insecticida, larvicida, repelente y trampa que propicia competencia insectil inter-específica, nematocida, fungicida, bactericida y compuesto alelopático.

Usos medicinales y farmacológicos

Como producto medicinal este género es usado en el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por bacterias, en infecciones dermatomucosas causadas por hongos, en enfermedades de los ojos y úlceras, y en enfermedades virales en animales

Serrato y Quijano (1993), también es empleado en personas con problemas hepáticos (Serrato-Cruz, 2004).

El aceite esencial de la hojas y tallos de cempasúchil, actúa como antibiótico contra diferentes bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* y combate los siguientes hongos: *Candida albicans*, *Candida utilis* y varias especies de *Aspergillus* incluyendo el *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* (Ecoosfera, 2013).

Khulbe *et al.* (2013), evaluaron el efecto antidepresivo del extracto hidrometanólico de flores de *Tagetes erecta* a concentraciones de 12.5, 25 y 50 mg kg⁻¹ en ratones, donde hubo un efecto antidepresivo a una concentración de 25 mg kg⁻¹. Fernandes *et al.* (2009), evaluaron extractos etanólicos de flores de *Tagetes erecta*, donde mostraron que reduce el umbral convulsivo en pacientes epilépticos, dado que éstos contienen sedantes con actividad antiepiléptica. En otro estudio se evaluó la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de extractos de hojas de *Tagetes erecta* en ratones, empleando dosis administradas por vía intraperitoneal (IP) y ácido acetilsalicílico (ASA) y fenilbutazona como estándares; los extractos mostraron propiedades antinociceptivos y antiinflamatorios en dosis entre 200 y 400 mg kg⁻¹ (Shinde *et al.*, 2009).

Por otro lado, en la industria farmacéutica en la elaboración de cosméticos, shampoos y cremas (Young y Lowe, 2001).

La luteína, además de ser un antioxidante, presenta beneficios para la salud humana, siendo conocida como “el nutriente protector del ojo”, debido a que resguarda a las células de la mácula como un antioxidante y con esto la salud macular (Alves-Rodríguez y Shao, 2004).

Uso de pigmentos en la industria alimenticia

El cempasúchil es una fuente importante de carotenoides, el pigmento mayoritario es la luteína (85 % del total presente en la flor) (Philip y Berry, 1975). Sin embargo, también presenta cantidades significativas de zeaxantina, una de las xantofilas altamente cotizadas en el mercado (Bosma *et al.*, 2003). Para explotar los pigmentos florales en la industria, las inflorescencias tipo doble son las de mayor importancia y presentan una variedad de colores de amarillo pálido a naranja intenso, debido a la presencia de carotenoides, de los cuales el principal es la luteína (Del Villar-Martínez, 2007).

El mercado mundial de los pigmentos del cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) demanda productos orientados a la alimentación, y que tengan algún efecto benéfico en la salud humana (anticancerígeno y antioxidante).

Según Young y Lowe (2001), el género *Tagetes* se considera una especie multifuncional, principalmente en la industria alimenticia, como aditivo dietético en fórmulas antioxidantes, combinado con otros ingredientes o solo; usado como colorante natural de la mantequilla, y en la pigmentación de pollos (Barzana *et al.*, 2002), yema de huevo, piel de camarón, piel de mojarra tilapia (Ponce-Palafox *et al.*, 2006), salmón y trucha arcoíris. *T. filifolia* o anisillo, por su característica de fuerte olor anisado, puede constituir un importante atractivo como saborizante en la industria de alimento (Cubillo-Sánchez *et al.*, 1999). *T. tenuifolia* como complemento vitamínico en la elaboración de alimentos.

Composición química del género *Tagetes*

La calidad en *Tagetes* (composición física y química), varía entre especies, y está determinada genéticamente y por la interacción con el ambiente (Marotti *et al.*, 2004).

Entre los compuestos más destacados en *Tagetes* se encuentran éteres, aldehídos, acetonas, carotenoides, flavonoides, cumarinas, tiofenos y terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, di-tri-tetra-politerpenos) (Marotti *et al.*, 2004; Krishna *et al.*, 2004; Escobar *et al.*, 2009). En el **Cuadro 1**. Se presentan los principales compuestos identificados (en porcentaje) en aceites esenciales de diferentes especies de *Tagetes*.

Cuadro 1 Principales compuestos de aceites esenciales (%), de especies diferentes de *Tagetes*.

Compuesto / Planta	<i>T. aff.</i> <i>maxima</i>	<i>T. filifolia</i>	<i>T. laxa</i>	<i>T. lucida</i>		<i>T. minuta</i>		<i>T. multiflora</i>	<i>T. patula</i>		<i>T. tenuifolia</i>		
		flor	flor	hoja	flor	hoja	flor	fruto		hoja	flor	hoja	flor
β -cariofileno	---	---	---	2.1	9.4	---	---	---	---	---	18.2	---	---
Dihidrotagetona	26.7	1	---	---	---	61.1	---	---	---	---	---	12.6	20.2
Dihidrotagetona	---	---	---	---	---	---	---	15.5	---	---	---	---	---
E- β -ocimeno	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E-anetol	---	67	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E-tagetona	---	---	---	---	---	9	58	---	---	---	---	9.8	---
E-tagetonona	22.4	---	33.2	---	---	---	---	---	17.2	---	---	41.6	24.7
limoneno	---	---	---	---	---	8.8	---	---	---	13.4	---	---	---
Alilanol estragol	y ---	30.3	---	93.8	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Metil eugenol	---	---	---	---	3.6	---	---	---	---	---	---	---	---
Piperitenona	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Piperitona	---	---	---	---	---	---	---	---	---	22.6	14.6	---	---
Terpinoleno	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Z- β -ocimeno	---	---	15.8	---	---	---	---	36.8	12.8	---	15	---	17
Z-tagetona	31.2	---	---	---	---	---	---	17.1	47.3	---	---	---	---
Z-tagetonona	---	---	27.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Referencia	Pichette <i>et al.</i> , 2005	Zygodlo <i>et al.</i> , 1993	Zygodlo <i>et al.</i> , 1993	Marotti <i>et al.</i> , 2004	Marotti <i>et al.</i> , 2004	Kaul <i>et al.</i> , 2005	Pichette <i>et al.</i> , 2005	Marotti <i>et al.</i> , 2004					

En el **Cuadro 2** se presentan los principales compuestos identificados (en porcentaje) de aceites esenciales de *Tagetes erecta*. Entre los componentes comerciales abundantes en el aceite esencial de *T. erecta* se encuentran: la piperitona, el terpinoleno y el limoneno (Krishna *et al.*, 2004). La piperitona se usa como principal materia prima para la producción de mentol y timol sintéticos. El terpinoleno, posee aroma floral y dulce por lo que se emplea en perfumería, cosmética y en materiales de limpieza. El limoneno se utiliza como fragancia en productos para el hogar (Meshkatalasadat *et al.*, 2010).

Cuadro 2 Principales compuestos de aceites esenciales (%) de *Tagetes erecta*.

Compuesto/planta	<i>T. erecta</i>	
	hoja	flor
Limoneno	7.6	---
Piperitenona	---	11
Piperitona	52.4	28.5
Terpinoleno	11.2	---
Referencia	Krishna <i>et al.</i> , 2004	

Los carotenoides son tetraterpenos naturales derivados de la unión de ocho unidades de isopreno, que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono. Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenoides compuestos (carbono e hidrógeno) que se denominan carotenos y los que contienen oxígeno que se denominan xantofilas (Rodríguez-Amaya, 2001).

La principal fuente natural de la luteína, son los pétalos de las flores de *Tagetes erecta* donde se encuentra formando ésteres con diferentes ácidos grasos (Skerget y cols., 2010). La luteína, es un carotenoide di-hidroxiado perteneciente a la clase de las xantofilas, presenta una estructura química con un amplio sistema de dobles enlaces conjugados, lo que le otorga su actividad antioxidante (Nachtigall, 2007). Este pigmento carotenoide es uno de los principales componentes de vegetales verdes, frutas de color naranja y yema de huevo, donde se puede encontrar libre o esterificada con ácidos grasos (Hojnik y cols, 2008).

Por ser un antioxidante biológico la luteína inactiva a los radicales libres producidos en la autooxidación de lípidos y/o atrapa oxígeno singlete, esta propiedad antioxidante se relaciona con su estructura, debido a la presencia de un elevado número de enlaces conjugados (Nachtigall, 2007).

Karousou *et al.* (2005), mencionan que el contenido y la calidad de los compuestos varían en función de factores ambientales, (Macías y Galindo, 2001) la fenología de la planta, los diferentes órganos de la que se extrae, el manejo agronómico y composición del suelo donde se desarrolla el cultivo. Por ello se encuentran diferencias en el contenido de compuestos, aún entre la misma especie.

Factores abióticos que modifican la producción y composición de metabolitos primarios y secundarios

Las plantas se encuentran frecuentemente en estrés, debido a que están expuestas a condiciones ambientales cambiantes que afectan su crecimiento, desarrollo y productividad (Buchanan *et al.*, 2000).

Salinidad

La salinidad, es uno de los factores que afectan negativamente la producción agrícola, dado que más de 800 millones de ha a nivel mundial son afectadas por la salinidad, lo que representa más de 6 % de la superficie del planeta. La salinidad afecta a los cultivos al causar desbalance nutrimental, estrés osmótico, deficiencia de agua y estrés oxidativo (Munns y Tester, 2008).

Entre cultivares de *Tagetes* se observan diferentes respuestas a la salinidad. El cultivar First Lady es moderadamente tolerante a salinidad, dado que las plantas muestran síntomas de toxicidad sólo cuando la conductividad eléctrica de una solución de $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ excede 7.9 dS m^{-1} (Huang y Cox, 1988). Valdez-Aguilar *et al.* (2009) reportan que los cultivares Flagstaff y Yellow Climax de *T. erecta* tienen un crecimiento aceptable con valores de conductividad eléctrica de la solución del suelo de 3.64 dS m^{-1} , clasificándose como cultivares sensibles. Recientemente, Escalona *et al.* (2012) reportaron que la salinidad afecta el crecimiento de esta especie, aunque no observaron síntomas específicos de toxicidad, por lo que *Tagetes* se puede considerar como una planta útil para programas de revegetación de áreas con problemas de salinidad, que están incrementando en México.

Efecto en aceites esenciales. La composición y cantidad de metabolitos secundarios de las plantas dependen en gran medida de factores ambientales. Cuando son sometidas a condiciones adversas, como salinidad se genera un efecto que desarrolla una respuesta en procesos fisiológicos, bioquímicos y metabólicos (Oyervides *et al.*, 2012). Esto indica la posibilidad de manipular la concentración o cantidad relativa de los metabolitos a través de técnicas de manejo agronómico.

La tolerancia al estrés causado por la salinidad ocasiona que las plantas modifiquen la síntesis de metabolitos secundarios (Wahid y Ghazanfar, 2006). En especies tolerantes a salinidad, el incremento en el contenido de antocianinas es una respuesta, cuando son sometidas a estrés salino (Parida y Das, 2005). Como consecuencia del estrés osmótico, debe inducirse en el citoplasma celular el ajuste osmótico, que conduce a la acumulación de osmolitos de bajo peso molecular como rafinosa, glicina betaína y prolina, así como de proteínas hidrofílicas de alto peso molecular de la superfamilia de proteínas, abundantes durante la embriogénesis tardía (Kosova *et al.*, 2011). Por otra parte, los fenoles derivados de fenilpropanoides, tales como flavonoides, taninos e hidroxicinamatos (ésteres), los cuales se producen bajo condiciones de diversas situaciones de estrés; representan importantes eliminadores de radicales libres (Selmar, 2008).

Los metabolitos secundarios como el aceite esencial, podrían no ser afectados o incluso incrementar su síntesis, esto contribuiría con los diferentes mecanismos de tolerancia al estrés salino (Collado *et al.*, 2012).

En la síntesis de aceites esenciales en respuesta a salinidad, los resultados son contradictorios. En manzanilla (*Matricaria chamomila*), regada con agua con diferentes niveles de salinidad (0, 84, 168, 252 y 336 mM NaCl), se registró el mayor contenido de aceites esenciales en el tratamiento testigo (Razmjoo *et al.*, 2008). En mejorana tunecina (*Origanum majorana*) se registró un incremento significativo (55.5 %) en el rendimiento de aceites esenciales cuando las plantas fueron regadas con aguas con conductividad eléctrica de 5 dS m⁻¹ respecto al testigo (0 dS m⁻¹); mientras que el aumento en la conductividad del agua de riego a 10 dS m⁻¹ redujo significativamente el rendimiento de éstos (Jelali *et al.*, 2011).

Efecto en pigmentos. Entre los antioxidantes no-enzimáticos se encuentran los carotenoides, mismos que se presentan de manera ubicua en plantas y se han reportado como importantes en la mitigación de efectos adversos de la salinidad en el crecimiento y metabolismo vegetal (Rawia *et al.*, 2011). Un ejemplo de esta relación directa entre el nivel de salinidad y concentración de carotenoides, se tiene en los resultados de Borghesi *et al.* (2011), quienes reportaron que el estrés salino puede conducir a incrementos similares o superiores de carotenoides y antocianinas (en el fruto de tomate), a aquellos logrados por la ingeniería genética; por tanto, esto representa una opción con potencial de explotación de los suelos salinos para obtener tomates con niveles mayores de metabolitos secundarios. Otro ejemplo se tiene en brotes de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* M.) tratados con 50 y 100 mM de NaCl, aquí la concentración de carotenoides fue dos veces más grande que las de plantas testigo (Lim *et al.*, 2012). En *Dunaliella salina* en condiciones hipersalinas presenta un descenso en el crecimiento celular, el flujo de carbón es canalizado hacia el incremento intracelular de glicerol, por consiguiente un aumento en la síntesis de isoprenoides plastídicos; bajo estas condiciones el glicerol funciona en el citoplasma como un soluto compatible para mantener la integridad de la membrana y proteínas, el aumento de la concentración de NaCl en el medio incide en el aumento de β -caroteno (Serpa-Ibañez y Calderón-Rodríguez, 2005).

Luminosidad

Muchos procesos fisiológicos en plantas se ven influenciados por la irradiación, que es uno de los factores del medio ambiente que afecta la supervivencia de la planta, el crecimiento, la reproducción y distribución (Keller y Luetge, 2005; Kumar *et al.*, 2013).

Efecto en aceites esenciales. La luz es factor clave en la producción final de muchos compuestos, ya que proporciona la energía necesaria para fijar carbono. Los estudios sobre rendimiento de aceite esencial en función de diferentes niveles de sombreado han demostrado que cada especie responde de manera diferente a la intensidad de luz. La especie *Thymus vulgaris* aumenta la concentración del aceite esencial como timol y mirceno cuando se cultivan en plena luz del sol al 100 % (Li *et al.*, 1996). Del mismo modo, altos niveles de nitrógeno (200 mg L⁻¹) y plena luz son significativos en la producción de metabolitos secundarios de *Hypericum perforatum*, como el contenido y rendimiento de hipericina debido al aumento en número y diámetro de glándulas foliares (Emart *et al.*, 2013). Por el contrario, estudios con *Anethum graveolens*, *Salvia officinalis* y *Pothomorphe umbellata* indican un mayor rendimiento de aceite esencial al cultivarlas bajo sombra (Marchese *et al.*, 2008). Al evaluar la composición química y rendimiento del aceite esencial en hojas de *Pothomorphe umbellata* sometidas a tres niveles de sombreado (30, 50, 70 y 100 %), el mayor rendimiento de aceite se tuvo en plantas con el 30 % de sombreado, identificando 26 componentes, predominando el trans-nerolidol (Souza *et al.*, 2010). Los anteriores resultados coinciden con otro estudio realizado con *Salvia sclarea* L. con cuatro niveles de sombreado (0, 25, 50, 75 %), resultando que el contenido y rendimiento de aceite se reduce al incrementar el sombreado; los componentes más abundantes fueron acetato de linalilo y esclareol con 25 % de sombreado, D-germacreno con 50 % de sombreado, y linalol sin sombreado (Kumar *et al.*, 2013).

La síntesis de metabolitos secundarios en *Hypericum perforatum* L. (hierba de San Juan) es influenciada por la intensidad luminosa. La luz no solo modifica el crecimiento y desarrollo vegetal, sino también la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios (Kurata *et al.*, 1997).

Efecto en pigmentos. Un exceso de luz puede desnaturalizar moléculas que forman parte integral de las membranas del aparato fotosintético, en especial a los carotenoides localizados en los plastos que durante el desarrollo de la lígula, son transformados de proplástidas en cromoplastos. (Long *et al.*, 1994).

En la biosíntesis de los carotenoides, la luz (la cantidad y calidad de ésta) es de vital importancia. La alta intensidad se traduce en una degradación de los carotenoides (Sánchez-Millán *et al.*, 2006), mientras que la baja intensidad, posiblemente modifica la ruta metabólica (Bungard *et al.*, 1999).

Sánchez-Millán *et al.* (2006), estudiaron el efecto de la RFA (Radiación Fotosintéticamente Activa) sobre soluciones de luteína en modelos *in vivo* e *in vitro* con *T. erecta*, para lo cual establecieron un experimento con cultivos sometidos a dos ambientes de luz solar (un invernadero de plástico e invernadero de vidrio); concluyen que la biosíntesis de carotenoides en *Tagetes erecta* puede ser afectada drásticamente por la cantidad y calidad de la luz y por el tiempo de exposición.

La luz juega un papel considerable en la inducción y expresión de genes carotenogénicos durante la transición de etioplastos a cloroplastos y durante el desarrollo de flores y frutos. Los fotoreceptores vegetales incluyen la familia de los fitocromos que absorben rango de luz del rojo y rojo lejano, tal como los criptocromos y fototropinas que absorben en el rango azul y UV-A. Los fitocromos son el tipo más caracterizado de fotoreceptor y su fotosensibilidad es debida a su conversión reversible entre dos isoformas que absorben luz, a los 660 nm (luz roja) y 730 nm (rojo lejano) (Pizarro y Stange, 2009).

Welsch *et al.* (2001) mencionan que hay una ruta ramificada como la formación de los carotenoides, suponiendo que existen puntos de control en cada ramificación, en el que están involucrados procesos transcripcionales y postranscripcionales.

En muchos estudios en hortalizas, frutales y ornamentales, en énfasis en *Tagetes* se ha encontrado la regulación transcripcional positiva y negativa de los genes carotenogénicos en sus diferentes etapas de desarrollo de las plantas, concluyendo que el gen PSY ejerce mayor control en el flujo de la ruta (Welsch *et al.*, 2001).

Por otro lado, vonLintig *et al.* (1997) mencionan que la intensidad luminosa aumenta la formación de carotenoides incrementando la expresión de ciertos genes; aunado a lo anterior, en mostaza se ha observado que la actividad de ARN mensajero del gen *PSY* (fitoeno sintasa) aumenta con la luz, mientras los niveles de *PDS* (fitoeno desaturasa) y *GGPS* (geranilgeranil pirofosfato sintasa) continúan constantes.

Hirschberg (2001), en un estudio con *Arabidopsis thaliana* y tomate, menciona que genes carotenogénicos (*lcyB*) incrementan cinco veces su expresión cuando las plantas se transfieren de un lugar de baja intensidad de luz a uno con alta iluminación. Por otro lado, Woitsch y Römer (2003) refieren que al inicio de tratamientos de luz roja, azul o blanca, se observó una inducción significativa de la expresión de genes carotenogénicos en plantas de tabaco, independientemente de la calidad de luz utilizada. Sin embargo, diferencias considerables en los niveles de expresión de genes carotenogénicos se observaron con respecto al tipo de luz usada para irradiar las plántulas; por ejemplo, genes *PSY* se indujeron significativamente después de irradiación con luz roja y blanca continuas, lo que apunta a que están involucrados diferentes receptores en la inducción de su expresión (Li *et al.*, 2008).

Durante el desarrollo de hojas, flores y en la maduración de frutos, la luz induce el aumento de la expresión de genes carotenogénicos; donde los fotorreceptores son activados al captar la energía lumínica y son traslocados al núcleo, de este modo inducen la transcripción de los genes (Pizarro y Stange, 2009).

Nutrición del cultivo

Efecto en aceites esenciales. En diversas investigaciones se ha reportado que la nutrición modifica, tanto en forma positiva como negativa, el contenido y composición química de los aceites esenciales; en estos estudios usualmente se evalúan distintos niveles y/o fuentes de un nutrimento particular en la composición y rendimiento de aceites, pero los mecanismos de acción de los nutrimentos hasta el momento no han sido totalmente comprobados. La nutrición de la planta es uno de los más importantes factores que incrementan la producción de aceites esenciales (Khalid, 2013).

En el caso del nitrógeno y su relación con la síntesis de aceites esenciales se afirma que su importancia radica en ser componente estructural de un gran número de compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas, enzimas, clorofila, alcaloides y ácidos nucleicos. Alrededor del 80 % del N que absorbe la planta, se utiliza para formar las proteínas, el 10 % ácidos nucleicos, el 5 % aminoácidos solubles, y el resto otros compuestos (Tischner, 2000).

Omidbaigi *et al.* (2008) en un experimento realizado en suelo con *Tagetes minuta* L., reportan incrementos significativos en la biomasa, contenido y porcentajes de los constituyentes del aceite esencial cuando se fertilizó con N a una dosis de 200 kg ha⁻¹, en comparación con dosis menores y en ausencia de fertilización nitrogenada. Por otra parte, Singh *et al.* (2008) indican que la aplicación de nitrógeno a plantas de *T. minuta* conduce a un incremento lineal de la biomasa y de la producción de aceites esenciales, precisando el nivel óptimo de fertilización de N 150 kg ha⁻¹, dosis con la cual se supera el rendimiento de aceites obtenido con dosis nitrogenadas de 0, 50 y 100 kg ha⁻¹, en 142, 49 y 23 %, respectivamente. Mientras tanto, Serrato-Cruz *et al.* (2014) evaluando la interacción del distanciamiento entre plantas y N en forma de urea en la producción de biomasa y rendimiento de aceite esencial de una población de *T. minuta*, encuentran que el aceite

esencial se incrementa al aplicar 120 kg de este elemento. En lavanda se ha demostrado que al adicionar fertilizante nitrogenado incrementa significativamente el contenido de aceite esencial (Arabaci *et al.*, 2007; Biesiada *et al.*, 2008), esta aplicación no debe exceder los 100 kg ha⁻¹.

El potasio, es un elemento importante en la síntesis de aceites esenciales al encontrarse en altas concentraciones en la planta, particularmente en tejidos meristemáticos y en el floema (Nurzynsla-Wierdak, 2013); se ha reportado que no tiene efecto en el rendimiento de aceites esenciales, pero sí modifica la composición química de éstos debido al efecto antagónico de este nutrimento en la absorción de otros cationes como sodio, calcio y particularmente magnesio (Ezz El-Din *et al.*, 2010).

El potasio es el macronutrimento y catión más abundante en las plantas superiores. En un estudio con *Calendula officinalis* se demostró que la mayor acumulación de aceites esenciales es posible con una dosis de 173.2 kg ha⁻¹ de este elemento, con respecto al tratamiento control; al incrementar la dosis de K a 346.4 kg ha⁻¹ se identificaron 28 compuestos en el aceite (Khalid, 2013). En menta (*Mentha piperita*), la mayor producción de aceite esencial se obtuvo con una fertilización con K de 218 mg L⁻¹ (Mollafilabi *et al.*, 2010); en *Pimpinella anisum* L., al incrementar la dosis de fertilización potásica hay un incremento de anetol (Al-Awak, 2010).

Con la adición de azufre, otro macronutrimento, se reporta que al incrementar su dosis, se aumenta la producción de eucaliptol en el aceite de albahaca (Zheljazkov *et al.*, 2008). Caso inverso se reporta en el hierro, que al incrementar su aplicación en la producción de tomillo, se presentó un efecto represivo en el contenido de aceite esencial y en su composición química (Jabbari *et al.*, 2011). Otro estudio de Said Al-Ahl y Mahmoud (2010), con hierro y zinc, mencionan que al cultivar albahaca bajo estrés salino y

aplicaciones foliares de estos micronutrientes, se incrementa el contenido de aceite de linalol. Por otra parte, el fósforo, calcio, magnesio, azufre así como algunos micronutrientes tienen un papel fundamental en el desarrollo de plantas que producen aceites esenciales y en la biosíntesis de éstos (Prasad *et al.*, 2011).

En *Tagetes patula* los resultados indican que la fertilización incrementa el contenido de aceites sólo en algunas épocas del año, el contenido de aceite de las flores permanece al mismo nivel durante la fase de floración; es decir, no se ve modificado por la fertilización (Stojanova *et al.*, 2000).

Efecto en pigmentos. En relación a producción de pigmentos en *Tagetes erecta* tanto la nutrición vegetal, como el mejoramiento genético, densidad de plantación, sanidad vegetal entre otros incrementan la producción de flor fresca, como para obtener una mayor producción de carotenoides (Sreekala y Raghava, 2003; Kumar *et al.*, 2004).

Biacs *et al.* (1995) ubican que altas dosis de Mo disminuyen el contenido de carotenoides en raíces de zanahoria, pero elementos como Se y Zn estimulan un incremento en la síntesis de α -caroteno y luteína, aunque con una disminución de β -caroteno cuando hubo ligeros incrementos en el contenido de carotenoides totales.

En plantas de melón, Lester y Jifon (2005) observaron que aplicaciones foliares de potasio durante el desarrollo de la planta, incrementan significativamente el contenido de β -caroteno. Mientras que en plantas de morera, Kumaret *al.* (2006) encontraron que con deficiencia de Mg ocurre una disminución significativa (de 24 a 46 %) de pigmentos carotenoides.

Sin embargo, en plantas de nochebuena, Ayala *et al.* (2008) observaron que aplicaciones de calcio y boro ocasionaron una disminución en la concentración de clorofilas pero un

aumento en la pigmentación de brácteas, el cual fue acompañado de un incremento en la concentración de carotenoides.

Se ha demostrado que en cianobacterias y algas rojas, el agotamiento de nutrimentos provoca un descenso en el contenido pigmentario y en la tasa de fotosíntesis, así, en condiciones limitantes de nutrimentos, se ha observado un descenso en la concentración de ficobilinas que se pueden incrementar si se suministraba nitrógeno (Bartual *et al.*, 2002).

Mishra y Srivastava (1983) observaron en plantas de maíz (*Zea mays* L.), que el nitrógeno inorgánico especialmente nitrato, son importantes para dar protección a la degradación de carotenoides y clorofilas más que para la biosíntesis de éstos. Sujatha y Nagarajan (2013) demostraron en *Spirulina platensis* (Geitler) que el contenido de carotenoides totales incrementó cuando la concentración de nitrógeno aplicado fue menor.

Por lo anterior, esta investigación se conforma de cuatro experimentos. En el primero de ellos (Capítulo I) se presentan resultados de la evaluación de dos niveles de NaCl adicionados a una solución nutritiva a plantas de *T. erecta* var. Inca durante la fase de floración y posibles cambios en producción de biomasa, acumulación de algunos elementos en diferentes partes de la planta, carotenoides y aceites esenciales. Un segundo factor abiótico evaluado fue la luminosidad; ensayada a cuatro niveles utilizando mallas sombra y su influencia en la producción de metabolitos primarios y secundarios los resultados se presentan en el Capítulo II. El efecto de la nutrición nitrogenada (cuatro concentraciones en la solución nutritiva) en la producción de clorofila, carotenoides y aceites esenciales también se evaluó y los resultados se muestran en el Capítulo III. Finalmente, el Capítulo IV presenta los resultados de la evaluación conjunta de dos

factores abióticos: luminosidad (dos niveles) y nutrición nitrogenada (tres niveles) en respuestas agronómicas, fisiológicas y bioquímicas en cempasúchil.

En el contexto anterior, el objetivo general de esta investigación fue evaluar los factores de estrés en respuestas agronómicas, fisiológicas y de calidad en *T. erecta* var. Inca.

Conclusiones de la revisión de literatura y justificación general de la investigación

Tagetes erecta, más que una especie ornamental y una flor característica de México, puede ser una especie explotada de manera industrial por ser multifacética.

Una amplia gama de factores de estrés abiótico como salinidad, luz, deficiencia o toxicidad nutrimental, sequía, alta o baja temperatura, entre otros, son potencialmente perjudiciales para las plantas. En respuesta a estos factores, las plantas activan diversos mecanismos de índole molecular, bioquímico, fisiológico y morfológico, que les permiten modificar su metabolismo y desarrollar ciertas estrategias adaptativas para sobreponerse a dichos embates.

De los resultados de investigaciones anteriores en *T. erecta* se advierte que pocos de ellos se han enfocado a estudiar factores abióticos en cambios fisiológicos y químicos, especialmente los relacionados con la producción de pigmentos florales y aceites esenciales. La finalidad de este trabajo fue documentar experiencias de investigación sobre la influencia de algunos factores ambientales en *T. erecta* y, en lo posible, el conocimiento básico generado, ponerlo en práctica en beneficio de la producción agrícola.

Literatura citada

- Al-Awak RP. 2010. The effect of sowing dates and potassium fertilization on the yields and the quality of the produced essential oil of anise plant (*Pimpinella anisum* L.). Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.
- Alves- Rodrigues A, Shao A. 2004. The Science behind Lutein. Toxicology letters. 150:57-83.
- Angelopolita. 2014. Disponible en línea en: <http://elangelopolita.com/index.php/component/k2/item/145-cempohualxochitl-cempasuchil-color-del-sol-y-perfume-de-la-muerte-en-una-flor-mexicana>. Consultado el 22 de marzo del 2015.
- Ayala AJ, Castillo GAM, Valdez ALA, Colinas LMA, Pineda PJ, Avitia GE. 2008. Efecto del calcio, boro y molibdeno en el crecimiento de planta y pigmentación de brácteas en nochebuena. 31(2): 165-172.
- 2000Agro. 2001. Disponible en línea en: <http://www.2000agro.com.mx/agroindustria/luteina-pigmento-garantia-de-calidad-para-pollos/>. Consultado el 18 de enero de 2015.
- 2000Agro.2014. Disponible en línea en: <http://www.2000agro.com.mx/floricultura/producir-morelos-mas-de-250-ton-de-cempasuchil/>. Consultado el 26 de marzo de 2015.
- Bartual A, Lubián LM, Gálvez JA, Niell FX. 2002. Effect of irradiance on growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas salina* (Wilsloech) (Cryptophyceae). Ciencias Marinas 28(4): 381-392.
- Barzana E, Rubio D, Santamaria RI, García-Correa O, García F, Ridaura SVE, López-Munguía A. 2002. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). Journal Agricultural Food Chemistry (50): 4491-4496.
- Biacs PA, Daood HG, Kádár I. 1995. Effect of Mo, Se, Zn and Cr treatments on yield element concentration, and carotenoid content of carrot. J. Agric. Food Chem. (43): 589-591.
- Borghesi E, González-Miret ML, Escudero-Gilete ML, Malorgio F, Heredia FJ, Meléndez-Martínez AJ. 2011. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. Journal Agricultural Food Chemistry 59(21): 11676-11682.
- Bosma LT, Dole MJ, Maness ON. 2003. Crop ecology, management and quality. Crop Sci. 43: 2118-2124.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000. Membrane structure and inheritance of cell membranes. In: Biochemistry Molecular Biology of Plants. Ed. American Society of Plant Physiologist. Rockville, Maryland. 2-10 p.
- Bungard A, Ruban V, Hibberd M, Press C, Horton P, Scholes D. 1999. Unusual carotenoid composition and new type of xanthophyll cycle in plants. Proc Natl Acad Sci. USA. 96: 1135-1139.
- Chi MB, Flores PP, Rivera MR. 2002. Cempasúchil fuente importante de carotenoides. Ciencia y Desarrollo 165: 20-25.
- Collado CE, Gil A, Cosentino DJ. 2012. Efecto de la salinidad sobre el aceite esencial y la biomasa de dos genotipos de orégano (*Origanum* spp.) cultivados en invernáculo. Horticultura Argentina 31(75):32-39.
- Cubillo-Sánchez D, Sanabria-Durán G, Hilje-Quirós L. 1999. Evaluación de la repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre *Bemisia tabaci*. Manejo Integrado de Plagas 53: 65-71.
- Del Villar-Martínez AA, Serrato-Cruz MA, Solano-Navarro A, Arenas-Ocampo ML, Quintero-Gutiérrez AG, Sánchez-Millán JL, Evangelista-Lozano S, Jiménez-Aparicio A, García-Jiménez FA, Venegas-Espinoza PE. 2007. Carotenoides en *Tagetes erecta* L. la modificación genética como alternativa. Revista Fitotecnia Mexicana 30(2): 109-118.
- DiarioECO. 2014. Disponible en línea en: <http://www.diarioeco.com.mx/index.php/games/games/accessories/item/7364-puebla-primer-productor-nacional-de-flor-de-cempasuchil/7364-puebla-primer-productor-nacional-de-flor-de-cempasuchil>. Consultado el 15 de enero de 2015.
- Díaz-Cedillo F, Serrato-Cruz MA. 2011. Composición del aceite esencial de *Tagetes parryi* A. Gray. Rev. Fitotec. Mex. 34: 145-148.

- Ecoosfera. 2013. Disponible en línea en: <http://www.ecoosfera.com/2013/11/cempasuchil-usos-rituales-y-medicinales/>. Consultado el 12 de enero de 2015.
- Emart PJ, Reza MS, Toorchi M, Dabbagh AM. 2013. The influence of light intensities and nitrogen on growth of *Hypericum perforatum* L. Int. J. of Agriculture 3(4): 775-781.
- Escalona A, Valverde J, Dos Santos Coutinho, C, Salas MC. 2012. Preliminary study of the response of ornamental plants to the NaCl case I. *Tagetes erecta* L. Acta Hort. 937: 955-962.
- Escobar P, Herrera LV, Milena SL, Durán C, Stashenko E. 2009. Composición química y actividad anti-tripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia 41(3): 280-286.
- Ezz El-Din A, Hendawy SF, Aziz EE, Omer EA. 2010. Enhancing growth, yield and essential oil of caraway plants by nitrogen and potassium fertilizers. Int. J. Academic Res. 2(3): 192-197.
- Fernandes J, Harikiran H, Lokesh JS. 2009. Pharmacological evaluation extract of flowers of *Tagetes erecta* on epilepsy. Journal of Pharmacy Research 2(69):1035-1038.
- Gupta YC, Raghava SPS, Misra RL. 1999. Inheritance of male sterile apetalous inflorescence in African marigold. J. Ornam. Hort. New Series 2: 65-66.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoids biosynthesis in flowering plants. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 210-218.
- Huang ZT, Cox DA. 1988. Salinity effects on annual bedding plants in a peat-perlite medium and solution culture. J. Plant Nutr. 11: 145-159.
- Hulst AA, Meyer MMT, Breteler H, Tramper J. 1989. Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. Applied Microbiology Biotechnology (30): 18-31.
- Inca Rural. 2007. Ejercicio de rendición de cuentas a la sociedad. Disponible en línea en: http://inca.gob.mx/webfiles/INFORME_RENDICION_2007_2012_1.pdf. Consultado el 8 de septiembre de 2014.
- Industrias ALCOSA. 2015. Disponible en línea en: <http://alcosa.com.mx/home/>. Consultado el 23 de marzo del 2015.
- Informador. 2014. Disponible en línea en: <http://www.informador.com.mx/economia/2012/414390/6/el-huevo-mexicano-se-pinta-con-cempasuchil-de-china.htm>. Consultado el 25 de marzo del 2015.
- Jabbari R, Dehaghi MA, Sanavi AMM, Agahi K. 2011. Nitrogen and iron fertilization methods affecting essential oil and chemical composition of thyme (*Thymus vulgaris* L.) medical plant. Adv. Environ. Biol. 5(2):433-438.
- Jelali N, Dhifi W, Chahed T, Marzouk B. 2011. Salinity effects on growth, essential oil yield and composition and phenolic compounds content of marjoram (*Origanum majorana* L.) leaves. Journal of Food Biochemistry 35(5): 1443-1450.
- Karousou R, Koureas DN, Kokkini S. 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. Phytochemistry 66:2668-2673.
- Kaul PN, Bhattacharya AK, Rajeswara BR, Symasundar KV, Ramesh S. 2005. Essential oil composition of *Tagetes minuta* L. fruits. Journal of Essential Oil Research 17:184-185.
- Keller P, Luetttge U. 2005. Photosynthetic light-use by three bromeliads originating from shaded sites (*Ananas ananassoides*, *Ananas comosus* cv. Panare) and exposed sites (*Pitcairnia pruinosa*) in the medium Orinoco basin, Venezuela. Biol. Plant. 49: 73-79.
- Khalid AK. 2013. Effect of potassium uptake on the composition of essential oil content in *Calendula officinalis* L. flowers. Emir. J. Food Agric. 25(3): 189-195.
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT, Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. J. Proteomics 74: 1301-1322.
- Krishna A, Kumar S, Mallavarapu GR, Ramesh S. 2004. Composition of the essential oils of the leaves and flowers of *Tagetes erecta* L. Journal Essential Oil Research 16: 520-522.
- Khulbe A, Pandey S, Sah SP. 2013. Antidepressant-like action hydromethanolic flower extract of *Tagetes erecta* L. in mice and its possible mechanism of action. Indian Journal of Pharmacology 45(4): 386-390.

- Kumar R, Sharma S, Pathania V. 2013. Effect of shading and plant density on growth, yield and oil composition of clary sage (*Salvia sclares* L.) in North Western Himalaya. *The Journal of Essential Oil Research* 25(1): 23-32.
- Kumar TK, Kumar P, Nand SP. 2006. Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Scientia Horticulturae* 18(1): 7-14.
- Kumar A, Singh SK, Sharma SK, Raghava SPS, Misra RL. 2004. Comparison of seed-derived with micropropagated male-sterile plants of *Tagetes erecta* L. for F1 hybrid seed production. *Journal Horticulture Science and Biotechnology* 79 (2): 260-266.
- Kurata H, Matsumura S, Furusaki S. 1997. Light irradiation causes physiological and metabolic changes for purine alkaloid production by *Coffea arabica* cells. *Plant Sci.* 123: 197-203.
- Lester GE, Jifon JL. 2005. Supplemental foliar potassium applications during muskmelon fruit development can improve fruit quality, ascorbic acid, and beta-carotene contents. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(4): 649-653.
- Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Torbert R, Wurtzel TE. 2008. The maize phytoene synthase gene family: overlapping Roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiology* 147(3): 1334-1346.
- Li Y, Craker LE, Potter T. 1996. Effect of light level on essential oil of sage (*Salvia officinalis* and thyme (*Thymus vulgaris*). *Acta Horticulturae* 426:419-426.
- Lim J-H, Park K-J, Kim BK, Jeong J-W, Kim H-J. 2012. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chemistry* 135: 1065-1070.
- Long SP, Humphries S, Falkowski P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Ver. Plant Phys.* 45:633-662.
- Macías AF, Galindo CGJ. 2001. Terpenoides alelopáticos: estructura, actividad y aplicaciones. *In: Anaya AL, Espinoza GFJ, Cruz OR (coordinadores). Relaciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas. Instituto de Ecología. Plaza Valdés, S. A. de C. V. México, D. F.* 137-161.
- Marchese JA, Mattana RS, Ming LC, Broetto F, Vendramini PF, Moraes RM. 2008. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.) plants. *Photosynthetica* 46(4): 501-505.
- Marotti M, Piccaglia R, Biavati B, Marotti I. 2004. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research* 16: 440-444.
- Meshkatsadat MH, Safaei-Ghomi J, Moharramipour S, Nasserri M. 2010. Chemical characterization of volatile components of *Tagetes minuta* L. cultivated in south west of Iran by nano scale injection. *Digest Journal Nanomaterials Biostruction* 5: 101-106.
- Mishra SN, Srivastava HS. 1983. Role of inorganic nitrogen in the synthesis and degradation of chlorophyll and carotenoids in maize leaves. *Biologia Plantarum* 25(1): 21-27.
- Mollafilabi A, Hassan KZ, Rad H, Aroiee R. 2010. Effect of optimizing nitrogen and potassium application in Johnson nutrient solution on essential oil content of peppermint in hydroponics culture. *Acta Horticulture* 853: 157-160.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Nurzynsla-Wierdak R. 2013. Does mineral fertilization modify essential oil content and chemical composition in medicinal plants? *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 12(5): 3-16.
- Omidbaigi R, Dadman B, Fattahi F. 2008. Influence of nitrogen fertilization on the herb yield, essential oil content and composition of *Tagetes minuta* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 11(1): 45-52.
- Oyervides VFJ, Rivas MC, Benavides MA, Núñez GMA, Star VJ, Oranday CA, Robledo TV. 2012. Efectos de iones y sales en la productividad y acumulación de prolina en *Lippia graveolens* H.B.K. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 81:191-198.
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-349.
- Philip T, Berry JW. 1975. Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) flowers. *Journal Food Science* 40: 1089-1090.

- Piccaglia R, Marotti M, Pesenti M, Mattarelli P, Biavati B. 1996. Chemical composition and antibacterial activity of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* essential oils. *In: Proceeding of the 27th International Symposium on Essential Oils, Wien, Austria.* 1-7.
- Pichette A, Garneau FX, Collin G, Jean FI, Gagnon H, López JB. 2005. Essential oils from Bolivia. IV. Compositae: *Tagetes aff. maxima* Kuntze and *Tagetes multiflora* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research* 17:27-28.
- Pizarro L, Stange C. 2009. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia Investigación Agraria* 36(2): 143-162.
- Ponce-Palafox JT, Arredondo-Figueroa JL, Vernon-Carter EJ. 2006. Carotenoids from plants used in diets for the culture of the pacific White shrimpr (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 5(2): 157-165.
- Prasad A, Kumar S, Khaliq A. 2011. Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the field and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biol. Fertil. Soils* 47: 853-861.
- Rawia AE, Lobna S, Taha SM, Ibrahim M. 2011. Alleviation of adverse effects of salinity on growth, and chemical constituents of marigold plants by using glutathione and ascorbate. *Journal of Applied Sciences Research* 7(5): 714-721.
- Razmjoo K, Heydarizadeh P, Sabzalian MR. 2008. Effect of salinity and drought stresses on growth and essential oil content of *Matricaria chamomila*. *Int. J. Agric. Biol.* 10: 451-454.
- SAGARPA. 2011. Delegación en el Estado de México. *Comunicación Social.* 4 p.
- SAGARPA. 2012. Disponible en línea en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2012B582.aspx>. Consultado el 12 de diciembre del 2014.
- Said-Al Ahl HAH, Mahmoud AA. 2010. Effects of zinc and/ or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ozean J. Appl. Sci.* 3(1): 97-111.
- Sánchez-Millán J, Arreguín ER, Barradas L, Anaya LL, García JF. 2006. Efecto de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) en carotenoides *in vitro* e *in vivo*. *In: XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.* Guanajuato, México. 120 p.
- Selmar D. 2008. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Agric. For. Res.* 58: 139-144.
- Serrato-Cruz, MA. 2004. Cempoal-xóchilt: Diversidad biológica y usos. *Ciencia y Desarrollo en Internet.* Disponible en línea en: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Cempoalxochit%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Cempoalxochit%20(3).pdf). Consultado el 12 de noviembre de 2014.
- Serrato-Cruz MA. 2006. Manual Gráfico para la Descripción Varietal de Cempasúchil (*Tagetes* L.) Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS-SAGARPA) y la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México 100 p.
- Serrato-Cruz MA, Quijano ML. 1993. Uso de algunas especies de *Tagetes*: Revisión bibliográfica (1984-1992). *In: Memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: Importancia y Contribución de la Agricultura Tradicional.* Comisión de Estudios Ambientales y Centro de Enseñanza, Investigación y Capacitación para el Desarrollo Agrícola Regional (CEICADAR, Puebla), del Colegio de Postgraduados. México. pp. 228-238.
- Serrato-Cruz MA, Díaz-Cedillo F, Hernández-Medina D, Curiel-Rodríguez A. 2014. Two agronomical aspects of *Tagetes terniflora* HBK for essential oil production. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* 3(1): 9-13.
- Shaaya E, Rafaeli A. 2007. Essential Oils as Bio-rational Insecticides-Potency and Mode of Action. *In: Ishaaya I, Nauen R, Horowitz R. (eds.). Insecticides Design Using Advanced Technologies.* Springer. pp. 249-261.
- Shinde NV, Kanase KG, Shilimkar VC, Undale R, Bhosale AV. 2009. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Solvent Extracts of *Tagetes erecta* Linn (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8(4):325-329.

- Singh M, Tripathi RS, Singh S, Yaseen M. 2008. Influence of row spacing and nitrogen levels on herb and essential oil production and oil quality of *Tagetes minuta* L. Journal of Spices and Aromatic Crops. Journal of Spices and Aromatic Crops 17(3): 251-254.
- Souza MR, Ribero VMA, Marchense JA, Chau ML, Ortiz MMM. 2010. Shade level effects on yield and chemical composition of the leaf essential oil of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel. Sci. Agri. Piracicaba, Braz. 67(4): 414-418.
- Sreekala C, Raghava SPS. 2003. Exploitation of heterosis for carotenoid content in African marigold (*Tagetes erecta* L.) and its correlation with esterase polymorphism. Theoretical Application. Genetic. 106: 771-776.
- Stojanova A, Primova T, Anastassov Ch. 2000. Effect of mineral fertilization on the essential oil composition of *Tagetes patula* L. from Bulgaria. Journal of Essential Oil Research 12(5): 609-612.
- Sujatha KP, Nagarajan P. 2013. Optimization of growth conditions for carotenoids production from *Spirulina platensis* (Geitler). Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2(10): 325-328.
- TierraFertil.2014. Disponible en línea en: <http://tierrafertil.com.mx/producen-en-el-d-f-un-millon-de-flores-de-cempasuchil/>. Consultado el 20 de marzo del 2015.
- Timberlake CF, Henry BS. 1986. Plant pigment as natural food colors. Endeavour. (10): 31-36.
- Tischner R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. Plant Cell Environ. 23(10):1005-1024.
- Torres MMI. 2014. <http://www.periodicoenfoque.com.mx/2014/10/puebla-primer-productor-de-flor-de-cempasuchil-a-nivel-nacional/>. Consultado 12 de enero de 2015.
- Torres S. 2011. Disponible en línea en: http://www.wattagnet.com/Marigold_o_cempas%C3%BAchil_la_flor_maravilla_Escasea_en_el_mundo.html. Consultado el 8 de enero del 2015.
- Valdez-Aguilar LA, Grieve CM, Poss J. 2009. Salinity and alkaline pH in irrigation water affect marigold plants: I. Growth and shoot dry weight partitioning. HortScience 44(6): 1719-1725.
- Vasudevan P, Kashyap S, Sharma S. 1997. *Tagetes*: A multipurpose plant. Bioresource Technology (62): 29-35.
- Vega C. 2013. El Sol de Puebla. Disponible en línea en: <http://www.oem.com.mx/elsoldepuebla/notas/n3172300.htm>. Consultado el 8 de enero de 2015.
- Vizcarra M. 2014. Unión Puebla. <http://www.unionpuebla.mx/articulo/2014/10/29/economia/puebla-lider-en-produccion-de-cempasuchil>. Consultado el 12 de enero de 2015.
- Von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H. 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapsis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant J. 12(3):625-634.
- Wahid A, Ghazanfar A. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. Journal of Plant Physiology 163: 723-730.
- Welsch R, Beyer P, Huguene P, Kleining H, Von Linting. 2001. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during morphogenesis. Planta 211:846-854.
- Woitsch S, Römer S. 2003. Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. Plant Physiol. 132(3): 1508-1517.
- Young AJ, Lowe GM. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arc. Biochem. Bioph. 385: 20-27.
- Zheljazkov VD, Cantrell CL, Ebelhar MW, Rowe DE, Coker Ch. 2008. Productivity, oil content, and oil composition of sweet basil as a function of nitrogen and sulphur fertilization. Hort. Sci. 43(5):1415-1422.
- Zygodlo JA, Lamarque AL, Maestri DM, Guzman CA, Grosso NR. 1993. Composition of the inflorescence oils of some *Tagetes* species from Argentina. Journal of Essential Oil Research 5:679-681.

CAPÍTULO I. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y NUTRIMENTALES DE *Tagetes erecta* Linn. A CONDICIONES DE SALINIDAD

1.1. INTRODUCCIÓN

La salinidad en agua y suelos es un factor limitante en la agricultura de hoy día. A nivel mundial se considera que existen más de 890 millones de hectáreas afectadas por salinidad en diferentes grados, lo que representa aproximadamente 6 % de la superficie total mundial. En México, 10 % de la superficie irrigada está afectada por sales (Ruiz-Cerda *et al.*, 2007); en los cultivos causa desbalance nutrimental, estrés osmótico, deficiencia de agua y estrés oxidativo, mismo que altera las relaciones hídricas de la planta, la absorción y utilización de nutrimentos; y ocasiona acumulación de iones tóxicos (Munns y Tester, 2008; Munns, 2002). El cloruro de sodio (NaCl) constituye la principal fuente de estrés salino, y se calcula que cerca del 10 % de la tierra cultivable y el 24 % de las zonas de riego son afectadas por la salinidad que ocasiona (Pessarakli y Szabolcs, 2010).

Los iones Na⁺ son tóxicos para la mayoría de las plantas, y en algunas de ellas el crecimiento también es inhibido por altas concentraciones de iones Cl⁻ (Zhu, 2007), por lo que es necesario realizar evaluaciones de diversas especies y cultivares a este agente de estrés abiótico.

La tolerancia a la salinidad en plantas superiores es un rasgo fisiológicamente multifacético, por tanto involucra diversos mecanismos. Entre los más importantes se encuentran el ajuste osmótico, reducción en la absorción de Na⁺ por parte de las raíces y el incremento de eflujo de este ión fuera de la célula, secuestro intracelular de Na⁺, acumulación de K⁺ en citosol; secuestro tejido-específico de Na⁺, control de la carga de

este catión en el xilema, exclusión del Na^+ del vástago y tolerancia al estrés oxidativo (Zhu, 2003).

La familia Asteraceae incluye especies vegetales que presentan una amplia variación de formas de vida, y que se adaptan a diversas condiciones de suelo y clima (Rodríguez-Elizalde *et al.*, 2010), como el cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.), especie tolerante a algunas plagas y enfermedades, gracias a que produce compuestos fenólicos con poder larvicida efectivo contra *Culex quinquefasciatus* (Nikkon *et al.*, 2011). Además, Bosiacki y Wojciechowska (2012) reportan hiperacumulación de Ni en *T. erecta*, con concentraciones foliares de este elemento de 212 mg kg^{-1} de materia seca. Entre cultivares de esta especie se observan diferentes respuestas a la salinidad. El cultivar First Lady es moderadamente tolerante a salinidad, dado que las plantas muestran síntomas de toxicidad sólo cuando la conductividad eléctrica de una solución de $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ excede 7.9 dS m^{-1} (Huang y Cox, 1988). Valdez-Aguilar *et al.* (2009a) reportan que los cultivares Flagstaff y Yellow Climax de *T. erecta* tienen un crecimiento aceptable con valores de conductividad eléctrica de la solución del suelo de 3.64 dS m^{-1} , clasificándose como cultivares sensibles. Recientemente, Escalona *et al.* (2012) reportaron que la salinidad afecta el crecimiento de esta especie, aunque no observaron síntomas específicos de toxicidad, por lo que *Tagetes* se puede considerar como una planta útil para programas de revegetación de superficies con problemas de salinidad, limitante que se está incrementando en México.

En particular, para la tolerancia al estrés causado por la salinidad, las plantas modifican la síntesis de metabolitos secundarios (Wahid y Ghazanfar, 2006). Los metabolitos secundarios son referidos a menudo como compuestos que no tienen una función fundamental en el mantenimiento de los procesos vitales de las plantas, pero son

importantes para la interacción de la planta con su ambiente, su adaptación a éste y como defensa (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

De esta manera, en especies tolerantes a salinidad, el incremento en el contenido de antocianinas es una respuesta de éstas, cuando son sometidas a estrés salino (Parida y Das, 2005). Así también como una consecuencia del estrés osmótico, el ajuste osmótico en el citoplasma celular debe ser inducido, lo cual conduce a la acumulación de osmolitos de bajo peso molecular como rafinosa, glicina betaína y prolina, así como de proteínas hidrofílicas de alto peso molecular de la superfamilia de proteínas abundantes durante la embriogénesis tardía (Kosova *et al.*, 2011). Por otra parte, los fenoles derivados de fenilpropanoides, tales como flavonoides, taninos e hidroxicinamatos (ésteres); son producidos bajo diversas situaciones de estrés, y representan importantes eliminadores de radicales libres (Selmar, 2008).

Muchos de los osmoprotectantes incrementan la tolerancia a sales en la planta cuando son expresados en transgenes (Zhu, 2001). En las células de las plantas los osmoprotectantes están confinados en el citosol, los cloroplastos y otros compartimentos citoplasmáticos que en total pueden ser parte del 20 % del volumen total de las células maduras (el otro 80 % se encuentra en vacuola). Las concentraciones naturales de osmoprotectantes en los compartimentos del citoplasma pueden llegar a exceder una concentración de 200 mM. Tales concentraciones son osmóticamente significativas y su papel fundamental es mantener la turgencia de las células y el gradiente para la captación de agua durante las condiciones de estrés (González-Hernández y Peña, 2002).

Si bien, los efectos del estrés salino se han investigado ampliamente en cultivos, es necesaria la generación de información referente a las modificaciones del metabolismo primario, secundario y el balance nutrimental en plantas medicinales como lo es el cempasúchil, en respuesta a salinidad por lo que el objetivo de esta investigación fue

evaluar la tolerancia a la salinidad por NaCl del cv. Inca en la fase de floración. Dado que la salinidad puede afectar algunas variables fisiológicas y nutrimentales, se consideraron como variables respuesta la biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces, así como las concentraciones y acumulaciones de macronutrientes que son absorbidos por la planta como cationes (K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}) y de sodio (Na^+), concentraciones de carotenoides y flavonoides en flores, clorofilas en hojas; así como en la identificación y cuantificación de aceites esenciales por órgano, en cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal

La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero. Plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca (**Figura 1.1**), de 30 días emergidas se transplantaron a macetas de plástico negras de 1 L de capacidad, conteniendo como sustrato inerte una mezcla de tezontle: perlita (60:40, v:v). El diámetro del tezontle fue de 3 mm.



Figura 1.1 Material vegetal utilizado, plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn var. Inca).

1.2.2. Manejo del experimento

Una vez realizado el trasplante, las plántulas se regaron con agua de la llave (pH 7.3 y CE de 0.37 dS m^{-1}) durante siete días. Posteriormente fueron regadas con la solución nutritiva de Steiner al 25 % (Steiner, 1984) con las concentraciones ($\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$) siguientes: 3 de NO_3^- ; 0.25 de H_2PO_4^- ; 1.75 de SO_4^{2-} ; 1.75 de K^+ ; 2.25 de Ca^{2+} y 1 de Mg^{2+} . Esta solución nutritiva se complementó con micronutrientes a partir del producto comercial Tradecorp AZ™, en las concentraciones descritas por Trejo-Téllez *et al.* (2013). El pH de la solución nutritiva fue ajustado a 5.5 y ésta se suministró mediante un sistema de riego por goteo. Se realizaron dos riegos por día en cada maceta, cada una de ellas con un volumen de 150 mL. La solución nutritiva se almacenó en tanques de 200 L a los cuales se conectaron tubos de PVC hidráulico de 1" (2.54 cm). Cada gotero tuvo adaptadores de dos salidas, cada una con un tubín y estaca que fueron colocados en cada maceta. Los riegos fueron programados usando un temporizador y abastecidos con bombas de $\frac{1}{2}$ HP.

1.2.3. Tratamientos evaluados

Al inicio de la floración se adicionaron a la solución nutritiva los tratamientos con NaCl: 10 y 47 mM de NaCl, con valores de conductividad de 1.25 y 5.25, respectivamente. La adición de 10 mM de NaCl (1.25 dS m^{-1}) no causa daños ni afectaciones significativas de ningún tipo en esta especie (Valdez-Aguilar *et al.*, 2009), por tanto puede considerarse como un tratamiento de referencia. Se realizó una poda a los 31 días después del trasplante, desbotonando todas las plantas.

1.2.4. Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con 32 repeticiones. La unidad experimental consistió en una maceta con una planta.

1.2.5. Variables evaluadas

1.2.5.1. Biomasa seca y concentración nutrimental

Después de 30 días de establecer los tratamientos, cuando las plantas se encontraban en etapa de floración, las plantas fueron seccionadas en flores, hojas, tallos y raíces (se eliminó el sustrato de las plantas y éstas se enjuagaron con agua destilada) y secadas en una estufa de aire forzado a 70 °C por 72 h para determinar la biomasa seca. Las muestras secas se molieron en un molino de acero inoxidable marca Wiley Modelo 4 con malla tamiz de 40. Las concentraciones de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ se determinaron por digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). La lectura de los extractos obtenidos después de la digestión y filtrado se determinó en un equipo de espectroscopía de emisión atómica de inducción por plasma ICP-OES Varian modelo 725-ES.

1.2.5.2. Acumulación nutrimental

La acumulación de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ en flores, hojas, tallos y raíces se obtuvo a partir de los datos de concentración nutrimental y peso de biomasa seca previamente determinados.

1.2.5.3. Carotenoides totales en flores

La cosecha de las flores se realizó manualmente cuando éstas alcanzaron su mayor apertura. Las flores cosechadas se secaron en estufa de aire forzado (Felisa, FE291AD, México) a 40 °C por 48 h; posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Ohaus, Adventurer™Pro, Estados Unidos de América), se molieron y se almacenaron en recipientes de plástico con tapa a 4 °C, para su posterior análisis. La técnica de extracción

de carotenoides totales, se realizó con el método descrito por Nagata y Yamashita (2002). Las absorbancias de los extractos de diez repeticiones se leyeron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan®, Estados Unidos de América) a 453, 503, 645 y 663 nm de longitud de onda; para la estimación de carotenoides totales, los valores obtenidos se sustituyeron en la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides totales (mg/100 mL)} = (0.216)(A_{663}) - (1.220)(A_{645}) - (0.304)(A_{505}) + (0.452)(A_{453})$$

1.2.5.4. Flavonoides totales

La preparación de la muestra (secado, molido y almacenamiento) es la indicada en el apartado anterior para carotenoides. La concentración de flavonoides totales se cuantificó con un método modificado a partir de los descritos por Ghasemi *et al.* (2009), Ebrahimzadeh *et al.* (2008) y Nanyonga *et al.* (2013). Se pesaron 75 mg de material vegetal seco, se agregaron 1.5 mL de metanol al 80 % y se incubó durante una hora a 70 °C. Cuando el material se enfrió se procedió a centrifugar durante 20 min, a 4°C y a 15000 rpm. En un tubo de reacción se colocaron 200 µL del sobrenadante, se agregaron 600 µL de metanol al 80 %, 40 µL de cloruro de aluminio al 10 %, 40 µL de acetato de potasio 1 M y 1120 µL de agua destilada y se agitó al agregar cada solución. Se dejó reposar la solución durante 40 min a temperatura ambiente y a oscuridad, los extractos de las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Bausch and Lomb, Spectronic 20, Estados Unidos de América) a 415 nm. Para la elaboración de la curva de calibración que permitió estimar la concentración de flavonoides totales se utilizó como estándar quercetina.

1.2.5.5. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para esta determinación, al azar se seleccionaron cuatro plantas por tratamiento en flores, hojas, tallos y raíces. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 40 °C por 48 h (Felisa, FE291AD, México), ya secas, secas fueron molidas y se procesaron cada uno de los órganos de la planta por separado.

Para la identificación de compuestos se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con un cromatógrafo de gases (HP-6890) acoplado a un detector de masas (HP-5973). Se utilizó una columna HP-5MS (Largo 30 m, ID 0.250 mm, film 0.25 µm), velocidad promedio de 36 cm seg⁻¹. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: temperatura inicial de 40 °C por 5 min, primera rampa hasta 150 °C, con un aumento de 9 °C min⁻¹. Se mantuvo por 3 min, segunda rampa hasta 220 °C con un aumento de 9 °C min⁻¹. La fuente de iones a 230 °C, cuadrupolo a 150 °C. Inyector modo splitless, temperatura de 220 °C, 6.97 psi. Como gas acarreador se usó helio y se inyectó 1 µL de las muestras concentradas en forma manual.

En la identificación de terpenoides se usó el programa Data Analysis y la base de datos que se consultó fue NIST (National Institute of Standards and Technology), basándose en tiempos de retención de cada compuesto y los espectros de masas.

1.2.5.6. Clorofilas a, b y totales

La concentración de clorofilas, se determinó en hojas frescas por el método de Harbone (1973). La absorbancia de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb), a longitudes de onda de 663 y 645 nm. Los valores obtenidos se sustituyeron en las siguientes fórmulas para la estimación de los pigmentos fotosintéticos.

$$\text{Clorofila a} = (12.7 \cdot A_{663}) - (2.59 \cdot A_{645})$$

$$\text{Clorofila b} = (22.9 \cdot A_{645}) - (4.70 \cdot A_{663})$$

$$\text{Clorofila total} = (8.2 \cdot A_{663}) + (20.2 \cdot A_{645})$$

1.2.5.7. Azúcares totales en hojas y flores

Se determinó por el método descrito por Southgate (1976): para la solución madre se trituró 1 g de material vegetal, se agregaron 50 mL de etanol (80 %) y se calentó de 15 a 20 min, colocando de 3 a 4 perlas de ebullición. Se tomó 1 mL de esta solución para ser evaporada en baño maría, posteriormente se diluyó en agua destilada (20 mL). En tubos de ensayo se colocó 1 mL de esta dilución se adicionaron 2 mL de agua destilada y 6 mL de la solución de antrona. Posteriormente los tubos se colocaron en baño maría en ebullición por 3 min, se colocaron en agua fría y se leyó a 600 nm en espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb), usando una curva estándar de glucosa como referencia.

1.2.5.8. Aminoácidos libres totales

La determinación de aminoácidos libres fue en hojas y flores frescas mediante una triple extracción etanólica por Geiger *et al.* (1998). Se pesó 20 mg de material vegetal, se colocó en tubos de reacción para las extracciones etanólicas. Las extracciones etanólicas se realizaron incubando las muestras en baño maría durante 20 min a 80 °C; agregando 500 µL de etanol 80 %, 300 µL de etanol al 80 % y 500 µL de etanol al 50 %, respectivamente. La separación de fases se realizó por centrifugación (14,000 rpm, 5 min, 4°C). La concentración de aminoácidos libres se determinó empleando el método de ninhidrina (Moore y Stein, 1954), las muestras se leyeron en espectrofotómetro

(Spectronic 20, Bausch and Lomb) a una longitud de onda de 570 nm. Se utilizó leucina para la elaboración de la curva patrón.

1.2.5.9. Proteínas solubles totales

La extracción de proteínas fue en hojas y flores de acuerdo con lo descrito por Höfner *et al.* (1989). La cuantificación se hizo en 0.5 g de material vegetal con solución de negro amino, la lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb) a una absorbancia de 640 nm. Se utilizó albúmina de suero de bovino para la elaboración de la curva estándar.

1.2.6. Análisis de resultados

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente de acuerdo al diseño experimental empleado, usando análisis de varianza (ANOVA) del paquete estadístico SAS (SAS, 2011). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Biomasa seca

La biomasa seca de flores y tallos fue significativamente menor en el tratamiento con la aplicación de 47 mM de NaCl (5.25 dS m^{-1}) en comparación con el suministro de 10 mM (1.25 dS m^{-1}). En flores esta reducción fue de 42.6 %; mientras que en tallos de 16.5 % (**Figura 1.2**). No se observaron diferencias estadísticas en peso seco de hojas y raíces, con valores promedio de 0.74 y 0.40 g, respectivamente.

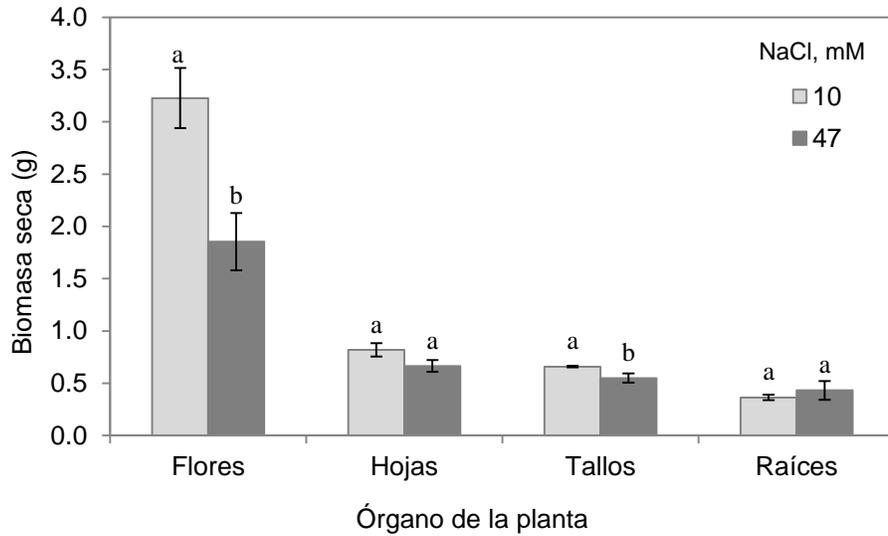


Figura 1.2 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de riego con solución nutritiva y dos concentraciones de NaCl. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

1.3.2. Concentración y acumulación de cationes (K, Ca y Mg) y de Na

El orden de concentración de K^+ fue diferente entre tratamientos. En plantas tratadas con 47 mM de NaCl la mayor concentración de K^+ fue registrada en hojas, seguida de flores, tallos y raíces (**Figura 1.3A**).

En todos los órganos existieron diferencias estadísticas en la concentración de K, con excepción de las hojas. En tallos y raíces, la relación entre la concentración de K^+ y la concentración de NaCl en la solución nutritiva fue negativa; es decir, a mayor concentración de NaCl en la solución nutritiva la concentración de K^+ es menor. En flores, por el contrario, la concentración de K^+ aumentó cuando la concentración de la NaCl en la solución nutritiva fue mayor (**Figura 1.3A**).

El orden de acumulación de K^+ en ambos tratamientos de NaCl fue el siguiente flores > hojas > tallos > raíces. La acumulación de K^+ en todos los órganos evaluados mostró diferencias significativas, observándose que la mayor concentración de NaCl en la solución nutritiva, redujo significativamente la concentración de K^+ en éstos (**Figura 1.3B**).

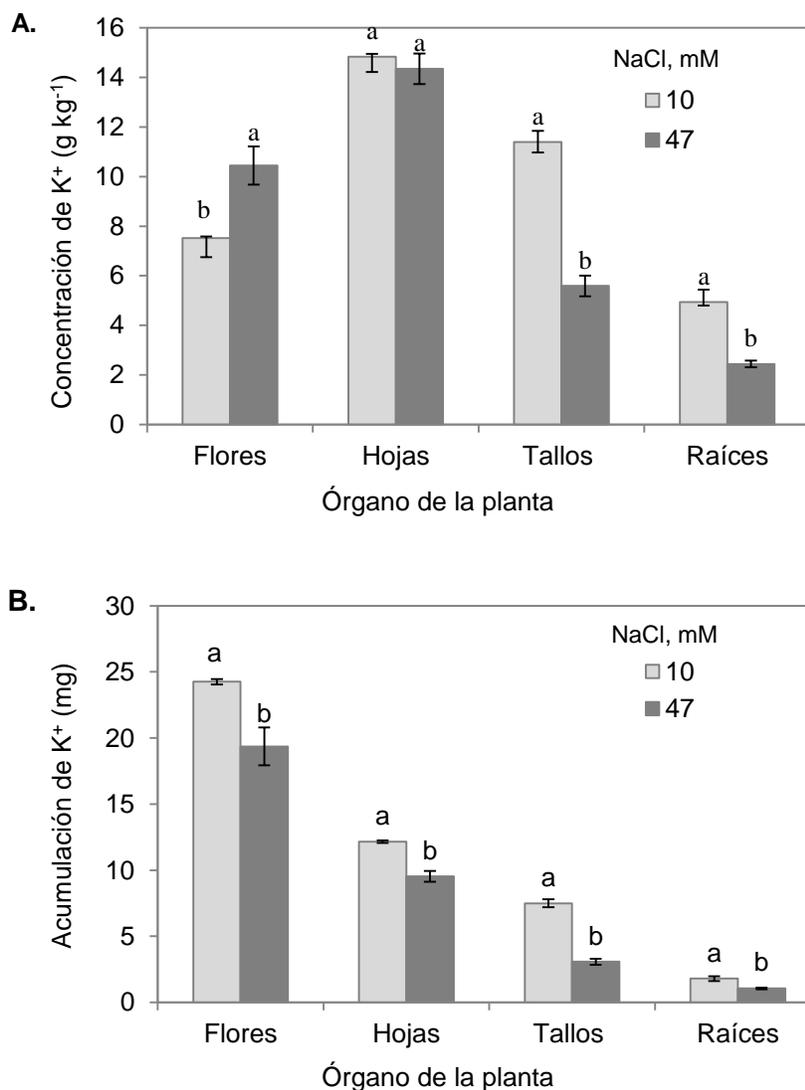


Figura 1.3 Concentración (A) y acumulación (B) de potasio en flores, hojas, tallos y raíces de *Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En hojas y raíces no existieron diferencias estadísticas entre tratamientos en la concentración de Ca. En flores y tallos con la mayor concentración de NaCl en la solución nutritiva se tuvieron las menores concentraciones de Ca^{2+} (**Figura 1.4A**). El orden de concentración de Ca, independientemente del nivel de NaCl adicionado, fue: hojas > raíces > tallos > flores.

La mayor acumulación de Ca^{2+} se registró en hojas, independientemente de la concentración de NaCl adicionada a la solución nutritiva. En hojas, flores y tallos existieron diferencias estadísticas significativas en la acumulación de Ca^{2+} entre tratamientos; existiendo una relación inversa entre acumulación de Ca^{2+} y NaCl en la solución nutritiva; es decir, mayor acumulación de Ca^{2+} cuando la concentración de NaCl fue menor. En raíces, la acumulación de Ca^{2+} no fue afectada por la concentración de NaCl adicionada en la solución nutritiva (**Figura 1.4B**).

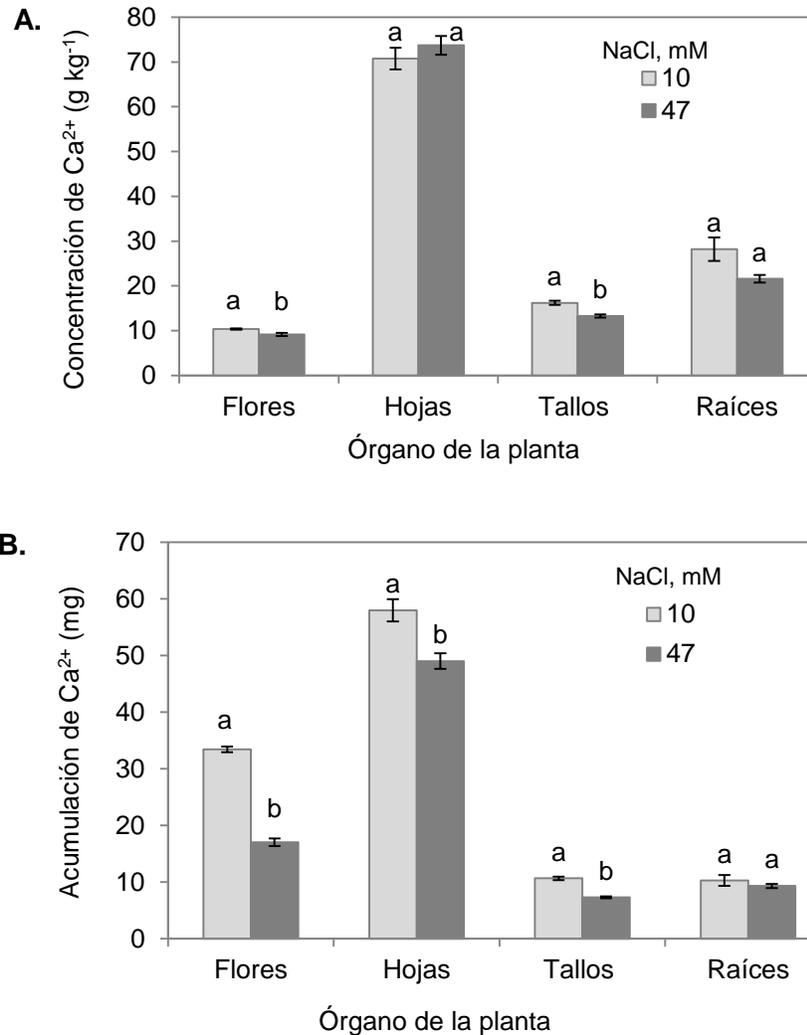


Figura 1.4 Concentración (A) y acumulación (B) de calcio en flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

La concentración de Mg²⁺ en los órganos de cempasúchil no fue afectada por los tratamientos con NaCl (**Figura 1.5A**). En la acumulación de Mg²⁺, existieron diferencias estadísticas significativas en flores, hojas y tallos, y se observó una relación negativa entre ésta y la concentración de NaCl en la solución nutritiva; es decir, con la mayor

concentración de NaCl en la solución nutritiva se registró la menor acumulación de Mg^{2+} (Figura 1.5B).

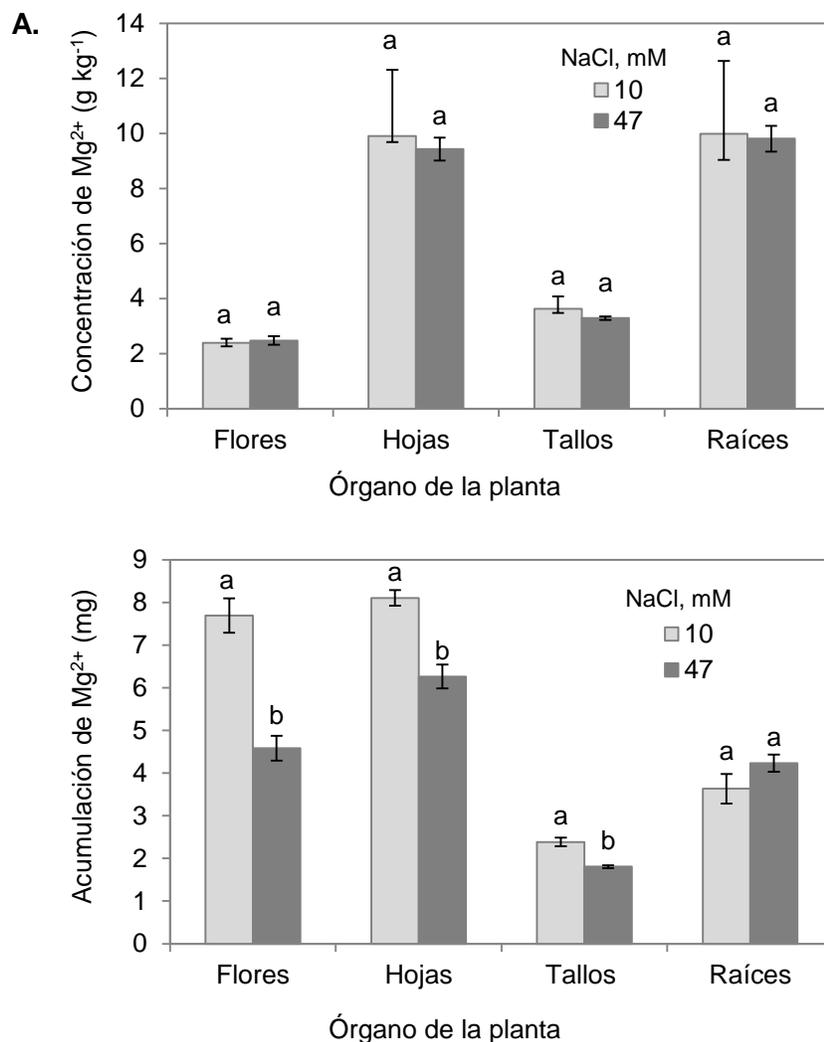


Figura 1.5 Concentración (A) y acumulación (B) de magnesio en flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En tallos, hojas y flores se tuvieron diferencias estadísticas significativas en la concentración de Na^+ entre tratamientos, observándose que con la mayor concentración

de NaCl adicionada a la solución nutritiva se registra la mayor concentración de este elemento en todos los órganos evaluados (**Figura 1.6A**).

La acumulación de Na⁺ en todos los órganos fue mayor con la concentración de 47 mM de NaCl en la solución nutritiva. Se destaca la menor acumulación de este elemento en hojas (**Figura 1.6B**), contrario a lo observado para los nutrientes K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺.

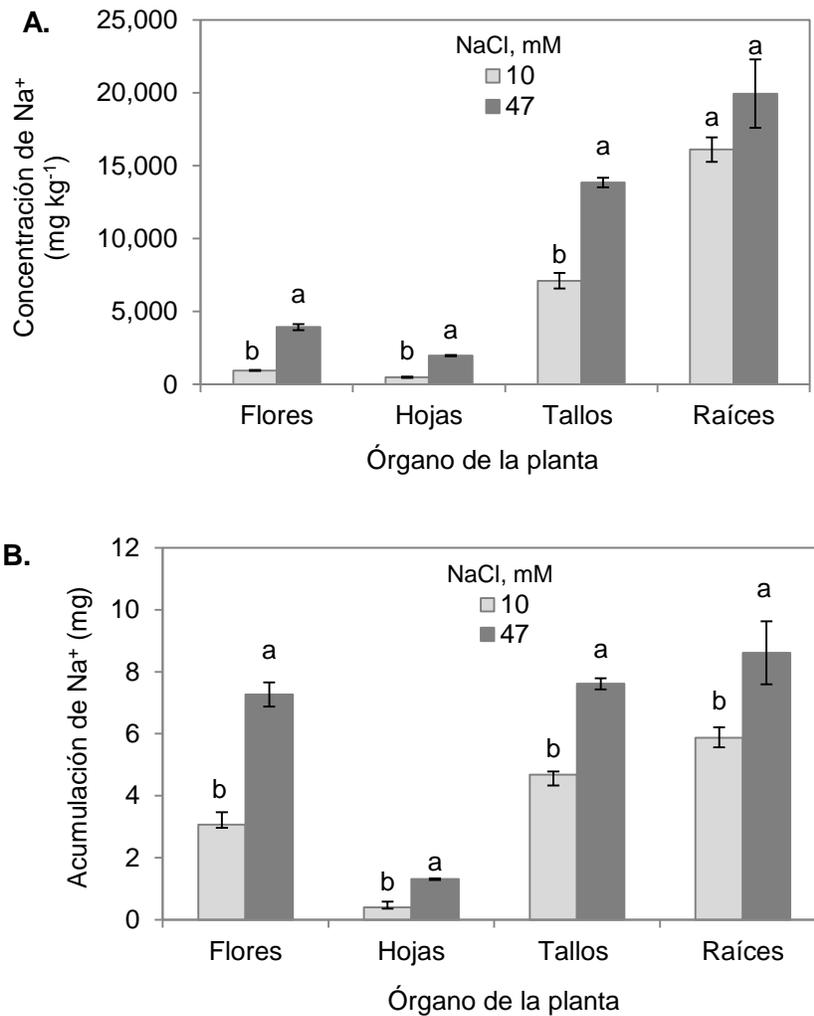


Figura 1.6 Concentración (A) y acumulación (B) de sodio en flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración después de 30 días de

tratamiento con dos concentraciones de NaCl. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

La sensibilidad de los cultivos a la salinidad varía de una fase de desarrollo a otra (Bernstein y Hayward, 1958). A medida que las plantas maduran, se vuelven progresivamente más tolerantes a la salinidad, particularmente en etapas avanzadas del ciclo. En tomate (*Solanum lycopersicum*), por ejemplo, al evaluar la tolerancia a la salinidad en la fase de crecimiento vegetativo temprano, en la fase de floración y a partir del desarrollo del fruto, ésta incrementó a medida que el tratamiento de salinidad se retrasó (del Amor *et al.*, 2001). Para el caso de producción de biomasa de hojas y raíces, los resultados de la presente investigación coinciden con lo anterior, ya que los tratamientos con NaCl iniciaron con la aparición del primer botón floral, aunque para flores y tallos si se observaron diferencias significativas por efecto de los tratamientos (**Figura 1.2**), lo cual puede tener explicación debido al genotipo evaluado.

Valdez-Aguilar *et al.* (2009a) evaluaron cinco niveles de conductividad eléctrica (2, 4, 6, 8 y 10 dS m⁻¹) en la solución nutritiva sobre la biomasa seca de los cultivares Flagstaff y Yellow Climax de cempasúchil y reportaron que a 4 dS m⁻¹, el peso seco de vástago disminuyó hasta 30 %; y que el estrés salino adicional no afectaba la producción de biomasa seca. También reportaron que el número y diámetro de flores son afectados negativamente con CE superior a 8 dS m⁻¹. En la presente investigación, dado que los tratamientos de NaCl fueron aplicados en la fase de floración, la biomasa seca en flores fue la más afectada; en éste órgano se observó una reducción de 42.6 % al adicionar 47 mM de NaCl (solución nutritiva con CE de 5.25 dS m⁻¹), en comparación con la adición de 10 mM de NaCl (solución nutritiva con CE de 1.25 dS m⁻¹).

Los iones Na^+ y K^+ comparten algunas propiedades similares y los transportadores no discriminan entre ellos, por lo que excesos de Na^+ pueden no sólo afectar negativamente la absorción de K^+ sino también conducen a la acumulación de Na^+ en las células vegetales (Pardo y Quintero, 2002). Esta tendencia es observada en la disminución de la concentración de K^+ en tallos y raíces de plantas tratadas con la mayor concentración de NaCl (47 mM). En hojas, la concentración de K^+ no fue afectada significativamente por la presencia de NaCl , mientras que en flores la concentración de este elemento fue mayor cuando la dosis de NaCl se incrementó (**Figura 1.3A**); no obstante al observar la acumulación de K^+ en los órganos evaluados (**Figura 1.3B**) se observa un antagonismo de Na^+ sobre K^+ .

Las concentraciones de K^+ en hojas del cv. Inca en esta investigación corresponden en porcentaje a 1.48 y 1.43 para los tratamientos con 10 y 47 mM de NaCl , respectivamente (**Figura 1.3A**). Valdez-Aguilar *et al.* (2009b) reportan concentraciones foliares de K^+ de aproximadamente 1.5 % en los cultivares Flagstaff y Yellow Climax regados con una solución nutritiva con un pH de 6.4 y una CE de 2 dS m^{-1} ; éstos se reducen en ambos cultivares a menos de 0.7 % con el aumento de la CE a 10 dS m^{-1} . En el cv. Double Eagle de la especie en estudio, Ahmad *et al.* (2011) reportan concentraciones de K^+ en hoja entre 2.8 y 2.9 %, en tanto que en el cv. Siracole, Pal y Ghosh (2010) determinan concentraciones foliares de K^+ entre 3.4 y 4 %. Sin embargo, ninguno de estos estudios consigna intervalos de suficiencia nutrimental para esta especie.

La reducción en la relación de concentraciones K^+/Na^+ en hojas se ha considerado como un indicador de desbalance iónico en diversas especies como arroz (Asch *et al.*, 2000; García-Morales *et al.*, 2012) y algodón (Ali *et al.*, 2008), entre otros. En este sentido, al considerar los resultados de concentración de K^+ y Na^+ en hojas (**Figuras 1.3A y 1.6A**,

respectivamente), se observa una disminución en el valor de esta relación en las hojas de cempasúchil de más de cuatro veces (30.6 vs 7.3) cuando la concentración de NaCl es incrementada de 10 a 47 mM en la solución nutritiva, lo que indica que la concentración de NaCl de 47 mM ocasiona desbalance iónico en hojas de cempasúchil.

La concentración de Ca^{2+} en hoja no fue afectada significativamente por la concentración de NaCl en la solución nutritiva) y se encontraron valores superiores a 7 % en ambos tratamientos (**Figura 1.4A**), lo cual es contrario a lo reportado por Valdez-Aguilar *et al.* (2009b) para los cultivares Flagstaff y Yellow Climax, dado que el incremento en la conductividad eléctrica en la solución nutritiva causó una disminución generalizada de la concentración foliar de Ca^{2+} , por lo que las concentraciones foliares de Ca^{2+} en estos cultivares variaron entre 5.4 y 5.7 %, cuando se regaron con soluciones nutritivas con CE de 2 dS m^{-1} , mientras que cuando la CE fue de 10 dS m^{-1} la variación varió entre 4.8 y 5 %.

En flores y tallos, el incremento en la concentración de NaCl en la solución nutritiva redujo significativamente la concentración de calcio (**Figura 1.4A**). En este sentido, Ebert *et al.* (2002) señalan que las relaciones catiónicas en vástago, como la de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ tienen una gran influencia sobre la tolerancia a la salinidad más que los niveles absolutos de sodio. La presencia de altas concentraciones de calcio inducen señales y la diferencia de concentración a través de la membrana plasmática resulta en un gradiente electroquímico que favorece el influjo de calcio. La relación de concentración $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ en el tratamiento consistente en la adición de 10 mM de NaCl a la solución nutritiva fue de 146.1; mientras que con el suministro de 47 mM de NaCl fue de 37.5.

El estrés osmótico causado por alta salinidad conduce a déficit hídrico, lo que reduce la transpiración y afecta negativamente el transporte a larga distancia de iones de baja

movilidad como el calcio, creando deficiencia de este elemento, particularmente en tejidos de rápido crecimiento (Maathuis, 2006). Reflejo de este estrés osmótico es el efecto negativo del NaCl sobre la acumulación de Ca^{2+} en flores, hojas y tallos (**Figura 1.4B**).

En el caso de Mg^{2+} , no se observa efecto de la salinidad sobre la concentración en los órganos evaluados (**Figura 1.5A**); por el contrario, en flores, hojas y tallos se evidencia una relación negativa entre la acumulación de Mg^{2+} y la concentración suministrada de NaCl (**Figura 1.5B**). Valdez-Aguilar *et al.* (2009b) reportan incrementos en la concentración foliar de Mg^{2+} a medida que se incrementa la conductividad eléctrica del agua empleada para el riego en *T. erecta*, con valores que oscilan entre 1.33 a 2.86 % en el cv. Flagstaff y de 1.02 a 2.67 % para el cv. Yellow Climax, con una CE de la solución empleada para el riego de 2 a 10 dS m^{-1} , respectivamente, en ambos casos. Las plantas difieren en sus respuestas a la salinidad y muchas especies tolerantes a este estrés acumulan Na^+ en todos sus tejidos; algunas otras, como las halófitas tienen mecanismos efectivos de exclusión mediante los cuales restringen la acumulación de niveles potencialmente tóxicos de Na^+ en sus hojas (Munns y Tester, 2008).

A pesar de la disminución de los valores en las relaciones de concentración de cationes esenciales y Na^+ en hoja previamente indicados, la baja concentración de Na^+ en hojas en comparación con la concentración de este elemento en raíces, así como la baja acumulación de este elemento en hojas en comparación con el resto de los órganos; evidencian la capacidad de exclusión de Na^+ del cv. Inca de esta especie (**Figura 1.6**). Mecanismos de exclusión de Na^+ en hojas en dos cultivares de *T. erecta* Linn. (Flagstaff y Yellow Climax) y en el cv. French Vanilla de *T. patula* los reportan Valdez-Aguilar *et al.* (2009b).

1.3.3. Carotenoides totales en flores

Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran los carotenoides, mismos que se presentan de manera ubicua en plantas y han sido reportados como actores vitales en la mitigación de efectos adversos de la salinidad en el crecimiento y metabolismo vegetal (Rawia *et al.*, 2011). Ejemplo de esta relación directa entre el nivel de salinidad y concentración de carotenoides, son los resultados de Borghesi *et al.* (2011), quienes reportaron que el estrés salino puede conducir a incrementos similares o superiores en el fruto de tomate de carotenoides y antocianinas, a aquellos logrados por la ingeniería genética; por tanto, esto representa una opción con potencial de explotación considerable de los suelos salinos para obtener tomates con niveles mayores de metabolitos secundarios. Asimismo, en brotes de trigo sarraceno (*Fagorpyrum esculentum* M.) tratados con 50 y 100 mM de NaCl, la concentración de carotenoides fue dos veces más grande a plantas testigo (Lim *et al.*, 2012). No obstante lo anterior, en esta investigación la concentración de carotenoides totales en flores fue reducida significativamente, con la adición de 47 mM de NaCl, en comparación con el suministro de 10 mM de NaCl; dicha reducción es del orden del 26.7 % (**Figura 1.7**).

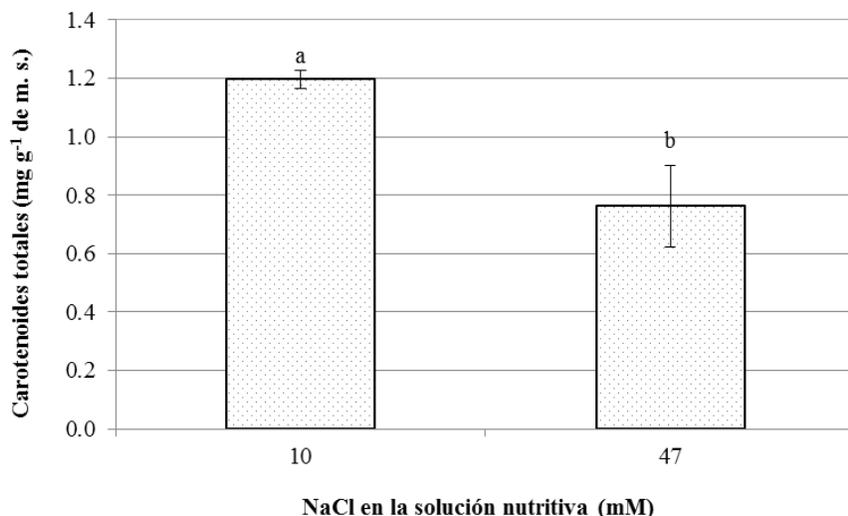


Figura 1.7 Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. m.s.=materia seca.

1.3.4. Flavonoides totales en flores

La concentración de flavonoides en flores tuvo una relación negativa con la concentración de NaCl en la solución nutritiva; observándose que el aumento de NaCl de 10 a 47 mM redujo en 27.9 % la concentración de éstos (**Figura 1.8**). De manera similar, en manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) tratada con diferentes niveles de NaCl (40, 80, 120 y 190 mM), se observó una reducción en la concentración de flavonoides respecto al testigo (sin NaCl); no obstante, con una concentración de NaCl de 40 mM, se encontró el mayor contenido de flavonoles 3-O-glicósidos, flavonoides más abundantes en flores de esta especie (Afzali *et al.*, 2007).

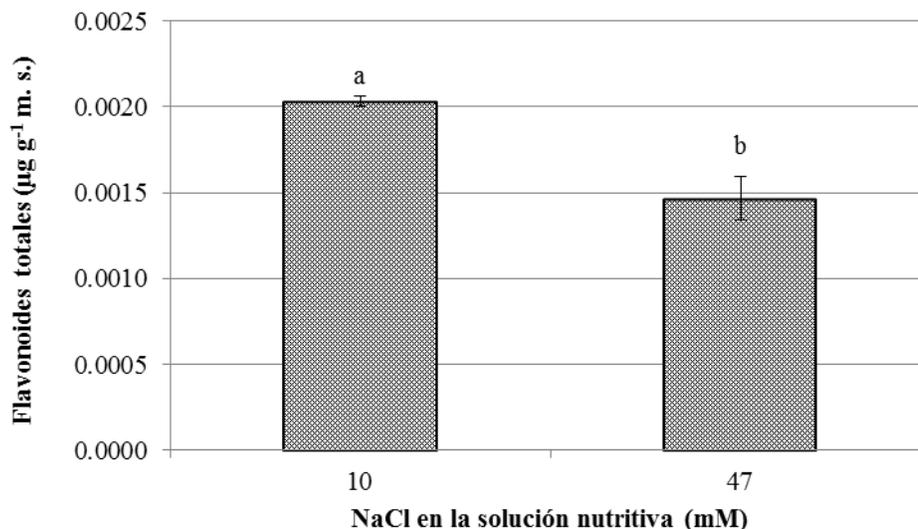


Figura 1.8 Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. m.s.=materia seca.

Contrario a los resultados de flavonoides obtenidos en este estudio, en hipocotilos y cotiledones de plántulas de tomate (*Solanum esculentum* cv. H-2274) y de col roja (*Brassica oleracea* convar. *capitata* (L.) Alef. var. rubra DC., cv. Möhrenkopf), se observaron incrementos graduales en las concentraciones de antocianinas, a medida que se incrementó la concentración de NaCl desde 0 a 150 mM (Eryilmaz, 2006).

1.3.5. Aceites esenciales por órganos

Los tiempos de retención de los compuestos de aceites esenciales identificados en hojas, flores, tallos y raíces se presentan en el **Cuadro 1.1**. Es importante destacar la amplia diferencia que existe en los componentes de aceites esenciales entre especies de *Tagetes*, dado que de los compuestos aquí identificados no coinciden con los reportados en *Tagetes coronopifolia* Willd, los cuales son: en raíces 2, 7, 7-trimetilbicyclo[3.1.1] heptan-2-ol y (1S, 2R, 5S) -4, 6,6-trimetilbicyclo[3.1.1] hept-3-en-2-ol (verbenol) (38 %); en

tallo-hoja, (1S) -6,6-dimetil-2-metilen-biciclo[3.1.1] heptan-3-ona , (1R)-cis-4,6,6-trimetilbicyclo-[3.1.1] hept-3-en-2-ona (verbenona), 2-oxo-decanoato de metilo y 2,7,7-trimetilbicyclo[3.1.1] hept-2-en-6-ona (crisantenona) (41 %); mientras en flores, (1S)-6,6-dimetil-2-metilen-biciclo[3.1.1] heptan-3-ona y verbenona (Díaz-Cedillo *et al.*, 2013).

Cuadro 1.1 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con dos niveles de NaCl.

Compuesto	Tiempo de retención, min	Compuesto	Tiempo de retención, min
D-Limoneno	12.21	β- Mirceno	11.36
Ocimeno	12.59	Piperitona	16.5
Cariofileno	19.47	Farneseno	20.04
α-Pineno	9.95	Óxido de cariofileno	23.2
Trans-pineno	27.5		

El número de compuestos y su concentración en el aceite proveniente de hojas, fueron superiores con el nivel bajo de salinidad evaluado (10 mM), siendo los más abundantes D-limoneno (8.52 %) y ocimeno (6.33 %) y superiores en 58.92 y 46.13 %, respectivamente, a los contenidos de éstos registrados en hojas de plantas tratadas con 47 mM NaCl. Asimismo, es importante destacar que solo con la adición de 10 mM NaCl, se identificaron trans-pineno, β-mirceno y piperitona (**Figura 1.9A**). Rawia *et al.* (2011) reportan que en aceite proveniente tejido fresco de plantas de *Tagetes erecta* sometidas a tres concentraciones de NaCl (salinidad), se encontraron diez compuestos: cis-β-ocimeno, β-farneseno, óxido de trans-linalool, piperetona, β-jonona, trans-cariofilasa, óxido de cariofilasa, eugenol, linalool y ácido hexa-decanoico metil éster; en todos éstos,

la concentración relativa fue reducida a medida que la concentración de NaCl se incrementó. Independientemente del tratamiento, los compuestos más abundantes fueron trans-cariofileno y eugenol. Así, este estudio coincide parcialmente con los resultados de esa investigación; es decir, una menor concentración relativa de aceites esenciales a medida que incrementa la concentración de NaCl; y difieren en la cantidad y tipo de compuestos identificados.

Contrario a los resultados obtenidos en hojas, en flores se encontraron tres compuestos en los aceites esenciales con mayor salinidad; mientras que con la menor salinidad solo dos, cariofileno y óxido de cariofileno. El farneseno solamente se identificó bajo mayor concentración de NaCl en porcentaje de 1.28 (**Figura 1.9B**). Coincidentemente, en plantas de menta (*Mentha piperita* L.) se observaron incrementos en algunos componentes de aceites esenciales en respuesta al tratamiento de NaCl, entre los que se encuentra el trans- β -farneseno en una concentración relativa de de 0.01 y 0.89 % correspondiente con los tratamientos 0 y 50 mM de NaCl, respectivamente; mientras que con 100 mM NaCl no se pudo detectar. En el caso de la concentración relativa de L-mentol, principal constituyente en el aceite esencial de esta especie, ésta incrementó gradualmente con el aumento de la dosis de NaCl a 50 y 100 mM (Khorasaninejad *et al.*, 2010).

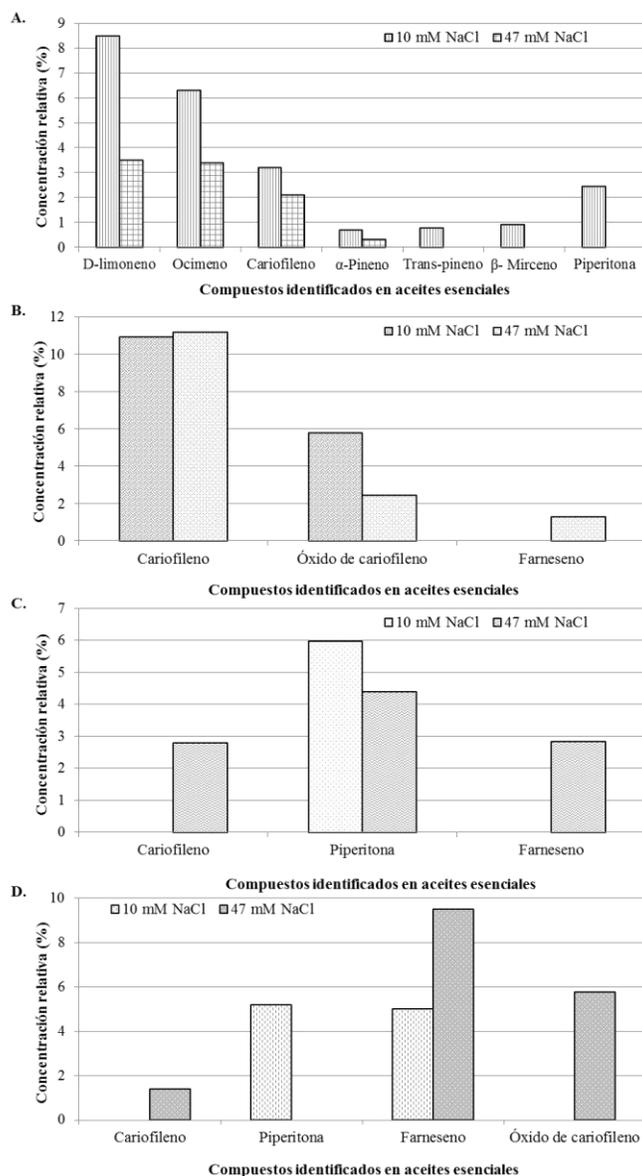


Figura 1.9 Aceites esenciales identificados en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración.

Tendencias similares a las registradas en flores, se observaron en tallos; es decir, tres compuestos identificados en plantas tratadas con 47 mM; mientras que solo la piperitona se detectó con la menor concentración de 10 mM NaCl; no obstante, su concentración superó en 26.63 % a la encontrada con mayor concentración de NaCl (**Figura 1.9C**).

En raíces, con la dosis alta de NaCl se identificaron cariofileno, farneseno y óxido de cariofileno; de éstos solo farneseno con el incremento en NaCl. Así también solo el compuesto piperitona se identificó en raíces de plantas sometidas a bajos niveles de salinidad (**Figura 1.9D**).

Consistentemente se observa que la concentración relativa de piperitona, en aceite proveniente de hojas, tallos y raíces fue afectada de manera importante por el aumento de la salinidad (**Figura 1.9**).

El incremento de contenido de aceite esencial, como el observado en flores, tallos y raíces de *T erecta var. Inca* se ha reportado en otras sometidas a factores que causan estrés osmótico. Los contenidos de aceite y de prolina esenciales de albahaca se incrementan cuando las plantas se sometieron a estrés hídrico; por el contrario, el crecimiento se inhibió significativamente (Baeck *et al.*, 2001). Así también, Hendawy y Khalid (2005), reportan que los contenidos de aceite esencial, carbohidratos totales y prolina aumentaron en forma significativa con el incremento en el nivel de estrés salino en plantas de salvia (*Salvia officinalis* L. Sage).

1.3.6. Concentración de clofofilas

En el **Cuadro 1.2** se presentan las concentraciones foliares de clorofilas bajo dos niveles de NaCl. Las concentraciones de clorofilas a y total no se afectaron por el nivel de NaCl adicionado a la solución nutritiva; mientras que, la concentración de clorofila b, fue estadísticamente superior con el tratamiento con baja concentración de NaCl (10 mM), en comparación con el de 47 mM.

Cuadro 1.2 Concentraciones foliares de clorofilas bajo dos niveles de NaCl.

NaCl, mM	Clorofila		
	a	b	total
10	67.42 ± 1.46 a	23.10 ± 0.51 b	91.43 ± 1.87 a
47	48.80 ± 2.73 a	15.02 ± 0.39 a	64.48 ± 5.82 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En un estudio con papaya (*Carica papaya* L.), donde se evaluaron distintas conductividades eléctricas (0.001, 2.0, 4.0 y 8.0 dS m⁻¹), se observó una reducción significativa del contenido de clorofila en plantas tratadas con 8 dS m⁻¹ de conductividad eléctrica (Parés y Basso, 2013). De igual manera, en trigo harinero el contenido de clorofila a disminuyó a medida que se incrementó la conductividad eléctrica hasta 12 dS m⁻¹ (Argentel *et al.*, 2009). En otro estudio realizado en plántulas de *Stylosanthes guianensis* y *Centrosema molle*, la concentración de clorofila a y total disminuyó significativamente con la adición de 200 mM de NaCl (Fuentes *et al.*, 2010).

Los trabajos sobre los efectos del estrés salino en las plantas se han centrado principalmente en el crecimiento, la acumulación de prolina, contenido de clorofila, relación K⁺/Na⁺, relación Ca²⁺/Na⁺, acumulación de Na⁺ y Cl⁻. Se ha dicho que los genotipos con una alta acumulación de prolina y contenidos de clorofila, así como con alta relación K⁺/Na⁺, y baja acumulación de Na⁺ y Cl⁻ son más tolerantes a la sal (Mane *et al.*, 2011). Considerando lo anterior, es posible afirmar que *T. erecta* var. Inca es una especie tolerante a niveles de NaCl de 47 mM.

1.3.7. Azúcares totales en hojas y flores

Gupta y Huang (2014) mencionan que para tolerar la salinidad las plantas requieren solutos compatibles acumulados tanto en el citosol como en los orgánulos, donde éstos

funcionan en el ajuste osmótico y osmoprotección. Una categoría principal de solutos osmóticos orgánicos consiste de azúcares simples (glucosa y fructosa), azúcares alcohólicos (glicerol e inositolos metilados) y azúcares complejos (trealosa, rafinosa y fructosano) y almidón que se acumulan bajo estrés salino. Sus funciones principales son como osmoprotectantes, en el ajuste osmótico, almacenamiento de carbono y la eliminación de radicales libres (Parida *et al.*, 2002). En esta investigación, tanto en hoja como en flor no hubo diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 1.10**).

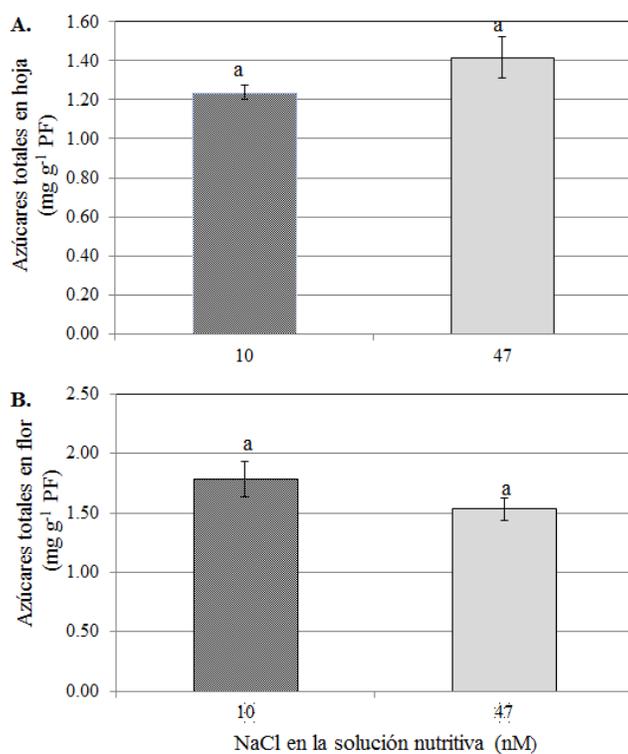


Figura 1.10 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

En un estudio con dos cultivares de sorgo dulce cultivados con solución nutritiva que contenía distintas concentraciones de NaCl (0, 30, 60 y 90 mM), se observó que a medida

que la salinidad aumenta, los contenidos de sacarosa y glucosa en los dos cultivares disminuyeron; mientras que por el contrario, el contenido de fructosa aumentó (Almodares *et al.*, 2008). Si bien no existieron diferencias en las concentraciones totales de azúcares tanto en hoja como en flores (**Figura 1.10**), Siringam *et al.* (2011), mencionan que la acumulación de azúcares se relaciona con una mayor concentración de sodio a nivel celular.

1.3.8. Aminoácidos libres totales en hojas y flores

En esta investigación la concentración de aminoácidos libres totales en hojas fue reducida significativamente, con la adición de 47 mM de NaCl, en comparación con el suministro de 10 mM de NaCl (**Figura 1.11A**). En flor esta variable no fue afectada significativamente por el nivel de NaCl (**Figura 1.11B**).

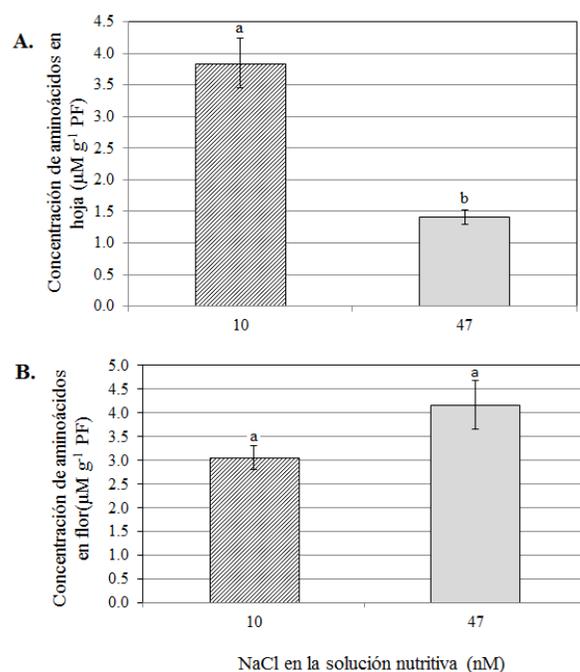


Figura 1.11 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

Se ha comprobado que las plantas bajo algún tipo de estrés incrementan la concentración de aminoácidos libres totales. Rawia *et al.* (2011) en *T. erecta*, se reporta que un tratamiento con NaCl con 300 mg L⁻¹, aumenta los niveles de aminoácidos como prolina, ácido glutámico y arginina en 5.26, 4.89 y 2.42 %, respectivamente, en comparación con el testigo. De manera similar Gilbert *et al.* (1998) mencionan que para *Coleus blumei* en condiciones de estrés salino hay acumulación de aminoácidos en tejido vegetal, principalmente de arginina, asparagina y serina. En las células de las plantas los osmoprotectantes están típicamente confinados en el citosol, cloroplastos y otros compartimentos citoplasmáticos que en total pueden ser parte del 20 % del volumen total de las células maduras (el otro 80 % se encuentra en vacuola). Las concentraciones naturales de osmoprotectantes en los compartimentos del citoplasma pueden llegar a exceder una concentración de 200 mM. Tales concentraciones son osmóticamente significativas y su papel fundamental es mantener la turgencia de las células y el gradiente para la captación de agua durante las condiciones de estrés (González-Hernández y Peña, 2002). Esta respuesta de acumulación de aminoácidos en hojas no se observó en este estudio con la dosis alta de NaCl que se evaluó; sin embargo, es importante destacar la diferencia significativa entre los dos tratamientos evaluados, mostrando que plantas tratadas con la dosis baja de NaCl tuvieron una concentración de aminoácidos superior en dos veces a la registrada en plantas con las dosis altas de NaCl (**Figura 1.11A**).

1.3.9. Proteínas solubles totales en hojas y flores

Uno de los mecanismos afectados por el estrés salino en plantas es la síntesis de proteínas, se sabe que el contenido de proteínas solubles es un indicador importante del estado fisiológico de las plantas (Doganlar *et al.*, 2010). La concentración de proteínas en

hojas de cempasúchil (**Figura 1.12A**), siguió una tendencia similar a la mostrada en concentración de aminoácidos libres totales en respuesta a la concentración de salinidad (**Figura 1.11**). En flor esta variable no fue significativamente afectada por el nivel de NaCl (**Figura 1.12B**).

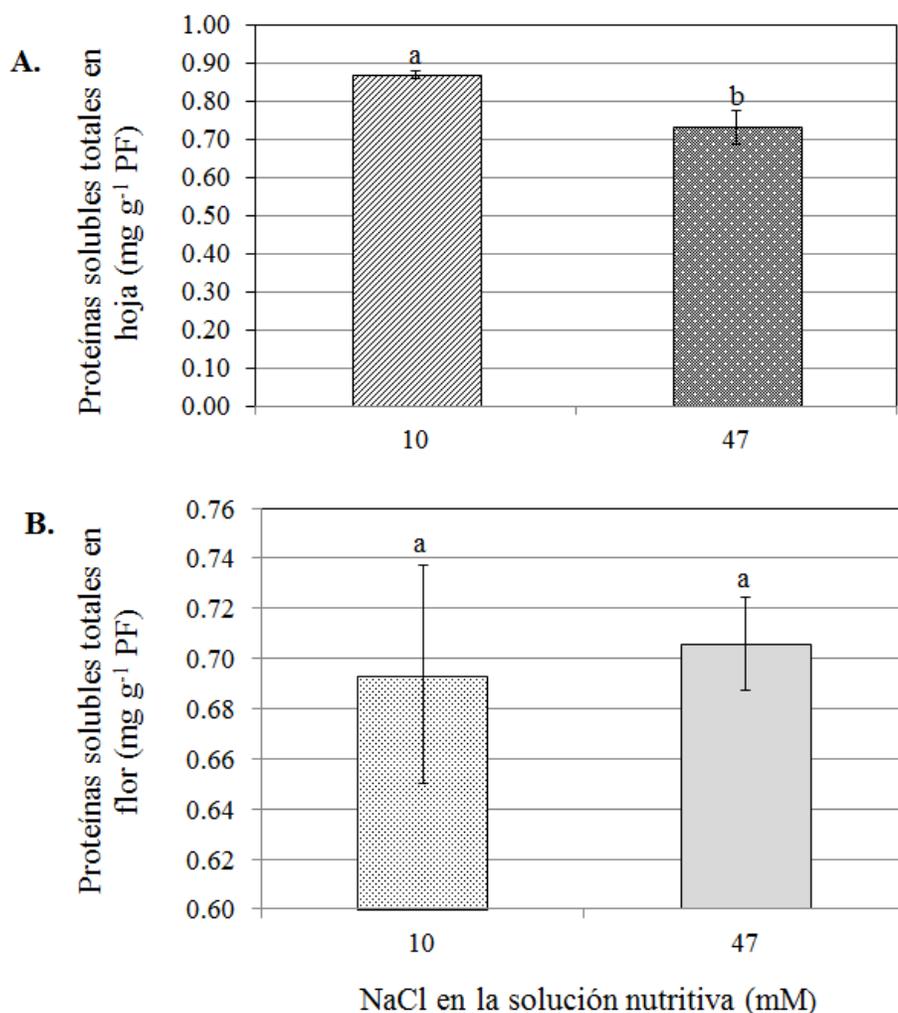


Figura 1.12 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

Según El-Monem y Sharaf (2008), en un estudio con cinco cultivares de lentejas egipcias se probó la tolerancia a diferentes niveles de salinidad (0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM), como resultado obtuvieron que en Giza 51, el contenido de proteínas solubles se incrementaron en el nivel más bajo de NaCl (50 mM), se redujo de manera significativa a 100 y 150 mM siendo altamente significativa en el contenido de proteínas en los brotes de los cultivares Giza 4 y Giza 370, en el presente estudio el comportamiento fue similar, a menor concentración de salinidad mayor contenido de proteínas solubles aunque pareciera que fuera lo contrario debido a que su nivel más bajo fue de 50 mM y en tanto que en este estudio el nivel más alto de salinidad fue de 47 mM; sin embargo, cuando incrementan la concentración de salinidad se reduce el contenido de proteínas solubles, esto pudiera deberse a la etapa fenológica en que fueron aplicados los tratamientos. De la misma manera, en un estudio con *Brassica juncea*-vivo el contenido de proteínas solubles en hoja disminuyen de manera gradual al incrementar el estrés salino (Hussain, 2013).

Aunado a lo anterior expuesto, *T. erecta* var. Inca es una especie moderadamente tolerante a la salinidad; al incrementar la dosis de NaCl presentó efectos negativos en la biomasa seca, cationes esenciales, metabolitos secundarios, contrario en clorofilas y otros metabolitos primarios se registraron efectos positivos al incrementar la salinidad. Sería interesante evaluar otras variedades a otras concentraciones de salinidad es decir podríamos evaluar una dosis intermedia y una más alta para conocer el comportamiento, o implementar el cultivo en un suelo salino en México.

1.4 CONCLUSIONES

La salinidad disminuyó la producción de biomasa en flores y tallos. Con la dosis más alta de salinidad en la solución nutritiva suministrada a plantas de cempasúchil durante la fase de floración se redujo la acumulación de cationes esenciales en parte aérea.

El cultivar Inca presentó capacidad de exclusión de Na^+ en hojas, el cual ha sido reportado como un mecanismo de tolerancia a Na^+ en especies vegetales.

La aplicación de 47 mM NaCl reduce los componentes y su concentración en el aceite esencial en hojas y aumentan en flores, tallos y raíces.

Las concentraciones de carotenoides y flavonoides disminuyeron con el incremento de NaCl; por el contrario, las concentraciones de clorofilas a y total no fueron afectadas por el nivel de NaCl, mientras que, la concentración de clorofila b se incrementó con el aumento en la concentración de NaCl.

La concentración de aminoácidos incrementó con dosis más alta de salinidad y las proteínas solubles totales disminuyeron con el incremento de NaCl en hojas y por el contrario, las concentraciones de azúcares totales no se vieron influenciadas por los tratamientos.

1.5 LITERATURA CITADA

- Afzali SFAD, Shariat MH, Hajabbasi MA, Moatar F. 2007. Salinity and drought stress effects on flower yield and flavonol-o glycosides in chamomile (*Matricaria chamomilla*). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 23(3-37): 382-390.
- Alcántar GG, SandovalVM. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial. Núm. 10. SMCS. Chapingo, México. 150 p.
- Almodares A, Hadi MR, Dosti B. 2008. The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrates contents in sweet sorghum. Research Journal of Environmental Sciences 2:298-304.
- Ahmad I, Asif M, Amjad A, Ahmad S. 2011. Fertilization enhances growth, yield, and xanthophyll contents of marigold. Turk. J. Agric. For. 35: 641-648.
- Ali L, Rahmtullah, Aziz T, Maqsood MA, Kanwal S, Ashraf M. 2008. Pattern of potassium and sodium distribution in two cotton varieties. Pak. J. Agri. Sci. 45(1):25-33.

- Argentel L, López DR, González LM, López RC, Gómez E, Girón R, Fonseca I. 2009. Contenido de clorofila e iones en la variedad de trigo harinero Cuba-C-204 en condiciones de estrés salino. *Cultivos Tropicales* 30(4):32-37.
- Asch F, Dingkuhn M, Dörffling K, Miezán K. 2000. Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. *Euphytica* 113(2):109-118.
- Baeck H, Kuenwoo P, Baeck HW, Park KW. 2001. Effect of watering on growth and oil content of sweet basil (*Ocimum americanum* L.). *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 19: 81-86.
- Bernstein L, Hayward HE. 1958. Physiology of salt tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 9:25-46.
- Borghesi E, González-Miret ML, Escudero-Gilete ML, Malorgio F, Heredia FJ, Meléndez-Martínez AJ. 2011. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 59(21): 11676-11682.
- Bosiacki M, Wojciechowska E. 2012. Phytoextraction of nickel by selected ornamental plants. *Ecol. Chem. Eng. S.* 19(3):331-345.
- Del Amor FM, Martínez V, Cerdá A. 2001. Salt tolerance of tomato plants as affected by stage of plant development. *HortScience* 36(7):1260-1263.
- Díaz-Cedillo F, Serrato-Cruz MA, De la Cruz-Marcial J, Sánchez-Alonso MG, López-Morales V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(4): 405-411.
- Doganlar ZB, Demir K, Basak H, Gull. 2010. Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research* 5(15): 2056-2065.
- Ebert GJ, Eberle H, Ali D, Ludders P. 2002. Ameliorating effects of Ca(NO₃)₂ on growth, mineral uptake and photosynthesis of NaCl-stressed guava seedling (*Psidium guajava* L.). *Scientia Hort.* 93:125-135.
- Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7(18): 3188-3192.
- El-Monem A, Sharaf M. 2008. Tolerance of five genotypes of lentil to NaCl-Salinity Stress. *New York Science Journal* 1(3): 70-80.
- Eryilmaz F. 2006. The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. *Biotechnol. & Biotechnol.* 20(1): 47-52.
- Escalona A, Valverde J, Dos Santos Coutinho C, Salas MC. 2012. Preliminary study of the response of ornamental plants to the NaCl case I. *Tagetes erecta* L. *Acta Hort.* 937:955-962.
- Fuentes L, Pérez Y, Alemán S, Sosa D, Sosa M, González, Infante D, Domínguez D, Mesa AR. 2010. Respuesta fisiológica y bioquímica de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* al estrés por cloruro de sodio. *Pastos y Forrajes* 33(2):1-16.
- García-Morales S, Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC, Caldana C, Espinosa-Victoria D, Herrera-Cabrera BE. 2012. Growth, photosynthetic activity, and potassium and sodium concentration in rice plants under salt stress. *Acta Scientiarum Agronomy* 34(3):317-324.
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 21: 253-268.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(3): 227-281.
- Gilbert GA, Gadush MV, Wilson C, Madore M. 1998. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blunaei* Benth, during salinity stress. *J. Exp. Bot.* 49:107-114.
- González-Hernández JC, Peña A. 2002. Estrategias de microorganismos de halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev. Latinoamericana Microbiol.* 44(3-4): 137-156.
- Gupta B, Huang B. 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>.

- Harbone JB. 1973. Chlorophyll extraction. *In*: Harbone JB. (ed.). *Phytochemical Methods. Recommended technique*. Chapman and Hall, London. pp. 205-207.
- Hendawy SF, Khalid Kh. A. 2005. Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. *J. Appl. Sci. Res.* 1: 147-155.
- Höfner R, Vásquez-Moreno L, Abou-Mandour AA, Bohnert HJ, Schmitt JM. 1989. Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 803-810.
- Huang ZT, Cox DA. 1988. Salinity effects on annual bedding plants in a peat-perlite medium and solution culture. *Journal of Plant Nutrition* 11: 145-159.
- Hussain A. 2013. Soluble protein contents from *in-vivo* and *in-vitro* sources of *Brassica juncea*, var. poorbiraya, under salt stress. *Biologia (Pakistan)* 59(2):341-344.
- Khorasaninejad S, Mousavi A, Soltanloo H, Hemmati K, Khalighi A. 2010. The Effect of Salinity Stress on Growth Parameters, Essential oil Yield and Constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *World Applied Sciences Journal* 11(11): 1403-1407.
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT, Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Proteomics* 74: 1301-1322.
- Lim J-H, Park K-J, Kim B-K, Jeong J-W, Kim H-J. 2012. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chemistry* 135: 1065-1070.
- Maathuis FJM. 2006. The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany* 57(5):1137-1147.
- Mane AV, Deshpande TV, Wagh VB, Karadge BA, Samant JS. 2011. A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. *International Journal of Environmental Sciences* 6: 1192-1216.
- Moore S, Stein W.H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211: 893-906.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-250.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59:651-681.
- Nagata M, Yamashita I. 2002. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 39: 925-928.
- Nanyonga SK, Opoku AR, Lewu FB, Oyediji OO, Singh M, Oyediji AO. 2013. Antioxidant activity and cytotoxicity of the leaf and bark extracts of *Tarhonianthus camphorates*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 377-383.
- Nikkon F, Habib MR, Saud ZA, Karim MR. 2011. *Tagetes erecta* Linn. and its mosquitocidal potency against *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. doi:10.1016/S2221-1691(11)60024-5.
- Pal P, Ghosh P. 2010. Effect of different sources and levels of potassium on growth, flowering and yield of African marigold (*Tagetes erecta* Linn.) cv. "Siracole" Indian *J. Natural Products Res.* 1(3):371-375.
- Pardo JM, Quintero FJ. 2002. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. *Genome Biol.* 3(6):1-4.
- Parés J, Basso C. 2013. Efecto del cloruro de sodio sobre el crecimiento y estado nutricional de plantas de papaya. *Bioagro* 25(2):109-116.
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-349.
- Parida AK, Das AB, Das P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* 45:28-36.
- Pessaraki M, Szabolcs I. 2010. Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. *In*: Pessaraki, M. (ed.). *Handbook of Plant and Crop Stress*. 3rd Edition. CRC Press, Taylor & Francis Publishing Company Florida. pp. 3-21.

- Ramakrishna A, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11): 1720-1731.
- Rawia AE, Lobna S, Taha, SM, Ibrahim M. 2011. Alleviation of adverse effects of salinity on growth, and chemical constituents of marigold plants by using glutathione and ascorbate. *Journal of Applied Sciences Research* 7(5): 714-721.
- Rodríguez-Elizalde MA, Delgado-Alvarado A, González-Chávez MCA, Carrillo-González R, Mejía-Muñoz JM, Vargas-Hernández M. 2010. Emergencia y crecimiento de plantas ornamentales en suelos contaminados por residuos de mina. *Interciencia* 35(1):26-32.
- Ruiz-Cerda E, Aldaco RA, Montemayor JA, Fortis M, Olague J, Villagómez JC. 2007. Aprovechamiento y mejoramiento de un suelo salino mediante el cultivo de pastos forrajeros. *Técnica Pecuaria Mexicana* 45:19-24.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Selmar D. 2008. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Agric. For. Res.* 58: 139-144.
- Siringam K, Juntawong N, Cha-Um S, Kirdmanee C. 2011. Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) roots under isosmotic conditions. *African Journal of Biotechnology* 10(8):1340-1346.
- Southgate DA. 1976. Determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers. LTD. London. 105 p.
- Steiner A. 1984. The universal nutrient solution. *In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture*. The Netherlands. 633-649 pp.
- Trejo-Téllez LI, Peralta-Sánchez MG, Gómez-Merino FC, Rodríguez-Mendoza MN, Serrato-Cruz MA, Arévalo-Becerril AE. 2013. Cloruro de sodio sobre biomasa seca y absorción de cationes macronutrientes en cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 979-990.
- Valdez-Aguilar LA, Grieve CM, Poss J. 2009a. Salinity and alkaline pH in irrigation water affect marigold plants: I. Growth and shoot dry weight partitioning. *HortScience* 44(6):1719-1725.
- Valdez-Aguilar LA, Grieve CM, Poss J, Layfield DA. 2009b. Salinity and alkaline pH in irrigation water affect marigold plants: II. Mineral Ion Relations. *HortScience* 44(6):1726-1735.
- Wahid A, Ghazanfar A. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology* 163: 723-730.
- Zhu J-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.
- Zhu J-K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6(5): 441-445.
- Zhu J-K. 2007. Plant Salt Stress. *Encyclopedia of Life Science*. University of California, Riverside, California, USA.

CAPÍTULO II. RESPUESTAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS Y DE CALIDAD EN CEMPASÚCHIL (*Tagetes erecta* Linn.) BAJO ESTRÉS DE LUMINOSIDAD

2.1. INTRODUCCIÓN

La luz es un factor fundamental para los procesos fisiológicos en las plantas, siendo el más importante de éstos la fotosíntesis; así también la luz proporciona la fuente de energía para su ciclo de vida, desde la germinación, desarrollo de la plántula y la transición al desarrollo productivo (floración) (Caldari, 2007; Chen *et al.*, 2004; Jiao *et al.*, 2007). Paradójicamente, hay un proceso que inhibe la fotosíntesis por exceso de radiación denominado fotoinhibición, que en gran medida afecta la producción en condiciones de campo. Además, las plantas de sufren estrés por una elevada radiación solar, debido a que pigmentos del complejo antena de los fotosistemas absorben más energía lumínica de la que puede utilizarse en el proceso de fotosíntesis (Tadeo, 2000).

Muchos procesos, que se ven influenciados por la irradiación, pueden afectar la supervivencia de la planta, su crecimiento, reproducción y distribución (Keller y Lüttgge, 2005; Kumar *et al.*, 2011).

La luz también influye en la temperatura de las hojas y en el balance hídrico, en la asimilación de carbono y en el crecimiento de órganos y tejidos. Particularmente incide en la germinación, el desarrollo y curvatura de tallos, expansión de hojas y floración (Caldari, 2007).

La radiación fotosintéticamente activa (RFA) es definida como la fracción útil de la radiación solar para el proceso de fotosíntesis. La absorción y utilización de ésta es uno de los factores más importantes que limitan la productividad de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Para contrarrestar los efectos de intensidad luminosa excesiva, se usan mallas sombra negras que son utilizadas en el cultivo protegido de plantas hortícolas como

técnica de control de la luz y temperatura (Ayala-Tafoya *et al.*, 2011). Si se considera que el calor se produce por la radiación infrarrojo cercano del espectro electromagnético o energía radiante del sol, una malla sombra ideal debería ser un filtro selectivo que detuviera esa radiación sin afectar la parte visible o útil para la fotosíntesis (Juárez-López *et al.*, 2011).

Por otra parte, la producción de metabolitos secundarios derivados de plantas medicinales y aromáticas, incluyendo los aceites esenciales, puede ser afectada por el sombreado, ya que el carbono fijado en la fotosíntesis es el componente fundamental de compuestos orgánicos (Páez *et al.*, 2000, Sangwan *et al.*, 2001). La síntesis de compuestos farmacéuticos en plantas medicinales es influenciada por cambios de intensidad luminosa y es de consideración su impacto en la morfología y fisiología de la planta (Briskin *et al.*, 2001). Por tanto, este factor no solo modifica el crecimiento y desarrollo vegetal, sino también la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios (Kurata *et al.*, 1997). Existen múltiples reportes relacionados con la influencia de la luminosidad en el rendimiento de aceite esencial, mismos que evidencian que cada especie responde de manera diferente a la intensidad de luz.

En tomillo (*Thymus vulgaris*) aumenta la concentración de timol y mirceno del aceite esencial cuando se cultiva a plena luz del sol (100 % de luminosidad) (Li *et al.*, 1996). Por el contrario, en estudios con eneldo (*Anethum graveolens*), salvia (*Salvia officinalis*) y cordoncillo (*Pothomorphe umbellata*) realizados por Marchese *et al.* (2008), se reporta un mayor rendimiento de aceite esencial al cultivarlas bajo sombra; así mismo, Souza *et al.* (2010) evaluaron la composición química y rendimiento del aceite esencial de hojas de plantas de cordoncillo (*Pothomorphe umbellata*) sometidas a tres niveles de sombreado (30, 50 y 70 %) y pleno sol (0 % de sombreado); registrándose el mayor rendimiento de

aceite en plantas con el 30 % nivel de sombreado, identificando 26 componentes, de todos el trans-nerolidol fue predominante.

En un estudio con salvia romana o amaro (*Salvia sclarea* L.) donde evaluaron cuatro niveles de sombreado (0, 25, 50, 75 %), se reportó que el contenido y rendimiento de aceite se redujeron con el incremento en el nivel de sombreado. Los componentes más abundantes fueron acetato de linalilo y esclareol con 25 % de sombreado, D-germacreno con 50 % de sombreado, y linalol sin sombreado (Kumar *et al.*, 2013).

Algunos mecanismos de protección a los fotosistemas, como medidas de disipación del exceso de energía lumínica son el ciclo Halliwell-Asada, el flujo cíclico de electrones alrededor del PSI (Fotosistema I), degradación de proteínas, el ciclo de las xantofilas entre otros (Casierra-Posada, 2007). Este último puede ser un mecanismo de defensa de la especie *T. erecta* debido al contenido de carotenoides presentes en las lígulas.

En una investigación donde se estudió el efecto de la luz en la acumulación de carotenoides en soluciones de luteína en *T. erecta*, realizada por Sánchez-Millán *et al.* (2006), los cultivos permanecieron bajo dos ambientes de luminosidad (un invernadero de plástico y otro de vidrio); en el invernadero de plástico se tuvo mayor concentración de xantofilas totales (3.12 g kg^{-1}) que en el de vidrio (2.14 g kg^{-1}); se concluyó que la biosíntesis de carotenoides es influenciada tanto por la cantidad y calidad de la luz como por el tiempo de exposición, ya que estas variables afectaron se afectó de las especies químicas de los carotenoides.

Ubaldo-Suárez (2007) evalúa los efectos de dos ambientes de radiación fotosintéticamente activa (RFA), con y sin malla, en el desarrollo y acumulación de carotenoides en lígulas de *T. erecta*. El cultivo sin malla recibió mayor RFA, en comparación con el que se encontraba bajo la malla. De acuerdo con lo anterior se presentó una reducción del diámetro de las cabezuelas y contenido de xantofilas totales,

en contraste con las cultivadas con malla. Por lo anterior, altas irradiaciones de RFA en cabezuelas de *T. erecta* ocasiona que la concentración de carotenoides (luteína y zeaxantina) disminuya.

Por otra parte, la biosíntesis fenólica requiere o es reforzada por la luz, la formación de flavonoides es absolutamente dependiente de la luz y su tasa biosintética está relacionada con la intensidad y densidad de la luz (Ghasemzadeh, 2010).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de distintos niveles de sombreado (niveles de luminosidad) tienen en aspectos morfológicos, fisiológicos y de calidad de *Tagetes erecta* Linn. var. Inca.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal

La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero, en agosto de 2012. Plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca de 30 días emergidas se transplantaron a macetas de plástico negras de 1 L de capacidad, conteniendo como sustrato inerte una mezcla de tezontle:perlita (60:40, v:v). El diámetro del tezontle fue de 3 mm.

2.2.2. Manejo del experimento

Una vez realizado el trasplante, las plántulas se regaron con agua durante siete días; posteriormente con una solución nutritiva de Steiner al 30% (Steiner, 1984) complementada con micronutrientes a partir del producto comercial Tradecorp AZ™, en las concentraciones descritas por Trejo-Téllez *et al.* (2013). El pH de la solución nutritiva fue ajustado a 5.5 y ésta se suministró mediante un sistema de riego por goteo. Se realizaron dos riegos por día en cada maceta, cada uno de ellas con un volumen de 150 mL. La solución nutritiva fue almacenada en un tanque de 200 L que se conectó a tubos

de PVC hidráulico de 1" (2.54 cm). Cada gotero tuvo adaptadores de dos salidas, cada una con un tubín y estaca que fueron colocados en cada maceta. Los riegos fueron programados usando un temporizador y abastecidos con bombas de ½ HP. Se realizó una poda a los 31 días después del trasplante, desbotonando todas las plantas.

2.2.3. Tratamientos evaluados

Al inicio de la floración (33 ddt), se aplicaron tratamientos, que consistieron en diferentes niveles de sombreado; a decir: 0, 30, 50 y 70 %; mediante el uso de mallas. Cada uno de los tratamientos tuvo 20 repeticiones. Se colocó un Data logger debajo de cada malla por tratamiento, para las mediciones ambientales.

A continuación se presentan la condiciones climáticas medias (intensidad luminosa, temperatura y humedad relativa) en cada uno de los tratamientos evaluados (**Cuadros 2.1, 2.2 y 2.3**).

2.2.4. Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, y como se mencionó con anterioridad, cada uno de los tratamientos tuvo 20 repeticiones. La unidad experimental consistió en una maceta con una planta.

2.2.5. Variables evaluadas

Las variables morfológicas evaluadas, se midieron 15, 30 y 80 días después del inicio de tratamientos.

Cuadro 2.1 Temperaturas máxima, mínima y media en °C, registradas en el invernadero con los cuatro porcentajes de sombreado evaluados en el año 2012.

Mes	Porcentaje de sombreado											
	0			30			50			70		
	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media
Septiembre	23.7	18.5	21.0	24.4	17.8	19.5	25.9	17.9	19.7	27.2	20.6	24.1
Octubre	23.2	17.4	19.8	23.2	16.2	18.5	24.1	16.3	18.6	27.3	15.9	23.2
Noviembre	19.1	14.6	17.1	17.4	14.3	15.9	17.5	14.1	15.9	17.1	13.6	15.7

Cuadro 2.2 Humedades relativas máxima, mínima y media en porcentaje, registradas en el invernadero con los cuatro porcentajes de sombreado evaluados en el año 2012.

Mes	Porcentaje de sombreado											
	0			30			50			70		
	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media
Septiembre	72.1	54.9	62.7	74.6	48.4	65.4	78.9	45.1	67.9	68.8	42.3	52.0
Octubre	66.5	36.5	55.7	70.4	34.3	58.0	73.8	39.1	60.6	65.8	28.4	45.4
Noviembre	73.1	51.1	60.3	75.8	51.1	62.4	78.9	52.8	64.6	75.4	53.3	62.6

Cuadro 2.3 Intensidades luminosas máxima, mínima y media en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, registradas en el invernadero con los cuatro porcentajes de sombreado evaluados en el año 2012.

Mes	Porcentaje de sombreado											
	0			30			50			70		
	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Mínima
Septiembre	968.1	471.3	785.1	306.8	1.9	220.3	257.0	166.0	206.2	330.7	52.2	247.9
Octubre	1014.1	1.1	696.0	282.3	0.8	224.4	269.3	1.0	211.8	299.5	1.1	203.2
Noviembre	885.2	191.8	560.2	296.8	179.3	243.8	229.6	79.7	156.4	237.8	58.8	170.0

2.2.5.1. Altura de rama lateral

La altura se determinó desde la superficie del sustrato y hasta el botón más alto de la rama lateral, utilizando un flexómetro graduado en cm.

2.2.5.2. Número de ramas primarias

Se cuantificó el número de ramas desde la base de la planta hasta la parte apical.

2.2.5.3. Número de botones cerrados

Se cuantifico el número de botones totales presentes en cada planta.

2.2.5.4. Número de botones semiabiertos

Se determinó el número de botones semiabiertos es decir aquellos en los que empezaba asomarse las lígulas en el botón.

2.2.5.5. Número de botones abiertos

Se cuantificó el número de botones completamente abiertos por planta.

2.2.5.6. Diámetro de cabezuelas

Se midió con un vernier digital (cm), en las cabezuelas abiertas por planta.

Las variables fisiológicas evaluadas se describen a continuación.

2.2.5.7. Biomasa seca y concentración nutrimental

Después de 40 días de establecer los tratamientos, las plantas se seccionaron en flores, hojas, tallos y raíces (se eliminó el sustrato y éstas se ejuagaron con agua destilada) y

secadas en una estufa de aire forzado a 70 °C por 72 h para determinar la biomasa seca. Las muestras secas se molieron en un molino de acero inoxidable marca Wiley Modelo 4 con malla tamiz de 40. Las concentraciones de P y K, se determinaron por digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). La lectura de los extractos obtenidos después de la digestión y filtrado se determinó en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma ICP-OES Varian modelo 725-ES. La concentración de N total se determinó empleando el método Semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965) utilizando ácido sulfúrico-salicílico para la digestión de las muestras.

2.2.5.8. Carotenoides totales en flores

La cosecha de las flores se realizó manualmente cuando éstas alcanzaron su mayor apertura (38 ddt). Las flores cosechadas se secaron en estufa de aire forzado (Felisa, FE291AD, México) a 40 °C por 48 h; posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Ohaus, Adventurer™Pro, Estados Unidos de América) y finalmente se molieron y almacenaron en recipientes de plástico con tapa a 4 °C, para su posterior análisis. La técnica de extracción de carotenoides totales, se realizó con el método descrito por Nagata y Yamashita (2002).

Las absorbancias de los extractos de diez repeticiones se leyeron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan®, Estados Unidos de América) a 453, 503, 645 y 663 nm de longitud de onda; para la estimación de carotenoides totales, los valores obtenidos se sustituyeron en la siguiente fórmula (Nagata y Yamashita, 2002):

$$\text{Carotenoides totales (mg/100 mL)} = (0.216)(A_{663}) - (1.220)(A_{645}) - (0.304)(A_{505}) + (0.452)(A_{453})$$

2.2.5.9. Flavonoides totales

La preparación de la muestra (secado, molido y almacenamiento) se realizó de la misma manera en que se describió en el apartado anterior para carotenoides. La concentración de flavonoides totales se cuantificó con un método modificado a partir de los descritos por Ghasemi *et al.* (2009), Ebrahimzadeh *et al.* (2008) y Nanyonga *et al.* (2013). Se pesaron 75 mg de material vegetal seco, se agregaron 1.5 mL de metanol al 80 % y se incubó durante una hora a 70 °C. Cuando el material se enfrió se procedió a centrifugar durante 20 min, a 4°C y a 15000 rpm. En un tubo de reacción se colocaron 200 µL del sobrenadante, se agregaron 600 µL de metanol al 80 %, 40 µL de cloruro de aluminio al 10 %, 40 µL de acetato de potasio 1 M y 1120 µL de agua destilada y se agitó al agregar cada solución. Se dejó reposar la solución durante 40 min a temperatura ambiente y a oscuridad, los extractos de las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Bausch and Lomb, Spectronic 20, Estados Unidos de América) a 415 nm. Para la elaboración de la curva de calibración que permitió estimar la concentración de flavonoides totales, se utilizó como estándar quercetina.

2.2.5.10. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Esta evaluación se realizó después de 38 días después del inicio de tratamientos de sombreado. Para esta determinación, cuatro plantas por tratamiento seleccionadas al azar fueron seccionadas en flores, hojas, tallos y raíz*es. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 40 °C por 48 h (Felisa, FE291AD, México), las muestras secas cada uno de los órganos de la planta se molió y se procesó por separado.

La identificación de compuestos se hizo, con un cromatógrafo de gases (HP-6890) acoplado a un detector de masas (HP-5973). Se utilizó una columna HP-5MS (Largo 30m, ID 0.250 mm, film 0.25 μm), velocidad promedio de 36 cm seg^{-1} . Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: temperatura inicial de 40 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, primera rampa hasta 150 $^{\circ}\text{C}$, con un aumento de 9 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Se mantuvo por 3 min, segunda rampa hasta 220 $^{\circ}\text{C}$ con un aumento de 9 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. La fuente de iones a 230 $^{\circ}\text{C}$, cuadrupolo a 150 $^{\circ}\text{C}$. Inyector modo splitless, temperatura de 220 $^{\circ}\text{C}$, 6.97 psi. Como gas acarreador se usó helio y se inyectó 1 μL de las muestras concentradas en forma manual.

En la identificación de terpenoides se usó el programa Data Analysis y la base de datos que se consultó fue NIST (National Institute of Standards and Technology), basándose en tiempos de retención de cada compuesto y los espectros de masas.

2.2.5.11. Clorofilas a, b y totales

La concentración de clorofilas, se determinó 40 días después de inicio de tratamientos, en hojas frescas por el método de Harbone (1973). La absorbancia de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb), a longitudes de onda de 663 y 645 nm. Los valores obtenidos se sustituyeron en las siguientes fórmulas para la estimación de los pigmentos fotosintéticos.

$$\text{Clorofila a} = (12.7 * A_{663}) - (2.59 * A_{645})$$

$$\text{Clorofila b} = (22.9 * A_{645}) - (4.70 * A_{663})$$

$$\text{Clorofila total} = (8.2 * A_{663}) + (20.2 * A_{645})$$

2.2.5.12. Azúcares totales en hojas y flores

Esta determinación se hizo en material vegetal tratado por 40 días con los diferentes niveles de sombreado. Se determinó por el método descrito por Southgate (1976): para la solución madre se trituró 1 g de material vegetal, se agregaron 50 mL de etanol (80 %) y se calentó de 15 a 20 min, colocando de 3 a 4 perlas de ebullición. Se tomó 1 mL de esta solución para ser evaporada en baño maría, posteriormente se diluyó en agua destilada (20 mL). En tubos de ensayo se colocó 1 mL de esta dilución se adicionaron 2 mL de agua destilada y 6 mL de la solución de antrona. Posteriormente los tubos se colocaron en baño maría en ebullición por 3 min, se colocaron en agua fría y se leyó a 600 nm en espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb), usando una curva estándar de glucosa como referencia.

2.2.5.13. Aminoácidos libres totales en hojas y flores

La determinación de aminoácidos libres fue en hojas y flores frescas tratadas con los niveles de sombreado por 40 días, mediante una triple extracción etanólica descrita por Geiger *et al.* (1998). Se pesaron 20 mg de material vegetal, se colocaron en tubos de reacción para las extracciones etanólicas. Las extracciones etanólicas se realizaron incubando las muestras en baño maría durante 20 min a 80 °C; agregando 1 mL de etanol 80 %, 600 µL de etanol al 80 % y 1 mL de etanol al 50%, respectivamente. La separación de fases se realizó por centrifugación (14,000 rpm, 5 min, 4 °C). La concentración de aminoácidos libres se determinó empleando el método de ninhidrina (Moore y Stein, 1954), las muestras fueron leídas en espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb) a una longitud de onda de 570 nm. Se utilizó leucina para la elaboración de la curva patrón.

2.2.5.14. Proteínas solubles totales en hojas y flores

Esta evaluación se realizó en tejidos tratados por 40 días con los diferentes niveles de sombreado. La extracción de proteínas fue en hojas y flores de acuerdo con lo descrito por Höfner *et al.* (1989). La cuantificación se hizo en 0.5 g de material vegetal con solución de negro amino, la lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 640 nm (Spectronic 20, Bausch and Lomb). Se utilizó albúmina de suero de bovino para la elaboración de la curva estándar.

2.2.6. Análisis de resultados

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente de acuerdo con el diseño experimental empleado, usando análisis de varianza (ANOVA) del paquete estadístico SAS (SAS, 2011). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Variables morfológicas

Después de 15 días de tratamiento no hubo diferencias estadísticas en las variables morfológicas de estudio como se observa en el **Cuadro 2.4**.

Cuadro 2.4 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes porcentajes de sombreado.

Sombreado (%)	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de botones cerrados
0	17.89±1.08 a	6.43±0.89 a	3.73±0.56 a
30	18.92±0.72 a	7.60±0.70 a	3.78±0.35 a
50	18.14±0.78 a	7.00±0.65 a	4.20±0.74 a
70	18.46±0.75 a	6.50±0.77 a	3.75±0.32 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En la evaluación realizada después de 30 días del inicio de tratamientos, se observa que los tratamientos de sombreado no afectaron significativamente la altura de la rama lateral y el número de botones cerrados. Por el contrario, el número de ramas primarias fue estadísticamente superior en el tratamiento sin sombreado en comparación con el resto de los tratamientos. El número de botones semiabiertos mostró una relación inversa con el porcentaje de sombreado, es decir, a mayor sombreado fue menor el número de botones semiabiertos (**Cuadro 2.5**).

El número de cabezuelas abiertas no muestra una tendencia relacionada con los tratamientos, dado que las medias más altas de esta variable se presentaron en los tratamientos sin sombreado y con 50 % de sombreado, este último fue estadísticamente diferente que el tratamiento de sombreado al 30 %. Por otra parte, es interesante notar

que a medida que se incrementó el nivel de sombreado el diámetro de las cabezuelas fue mayor, superando el diámetro de cabezuelas de plantas recibiendo un sombreado al 70 % a plantas sin sombreado en 27 % (**Cuadro 2.5**).

Cuadro 2.5 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes porcentajes de sombreado.

Sombreado %	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de botones cerrados	Número de botones semiabiertos	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuela, cm
0	19.66±0.79 a	6.80±0.55 a	2.35±0.65 a	0.75±0.46 a	1.90±0.32 a	3.59±0.27 b
30	19.99±0.86 a	5.70±0.75 b	2.50±0.38 a	0.40±0.34 ab	1.35±0.37 b	3.57±0.68 b
50	19.98±0.68 a	5.65±0.41 b	2.25±0.46 a	0.25±0.22 ab	1.90±0.22 a	4.45±0.20 a
70	19.56±0.83 a	5.35±0.52 b	2.55±0.53 a	0.20±0.21 b	1.85±0.37 ab	4.56±0.25 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En el último muestreo realizado después de 80 días del inicio de tratamientos solo se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el número de botones cerrados. La media más alta se registró en 30 % de sombreado; mismo que superó en 10.7, 28.6 y 55.4 % a los tratamientos sin sombreado, y con sombreados del 70 y 50 % respectivamente; empero, el tratamiento consistente en el sombreado de 30% solo fue estadísticamente diferente al tratamiento de 50 % de sombreado (**Cuadro 2.6**).

Cuadro 2.6 Significancia estadística del porcentaje de sombreado durante 80 días sobre variables de crecimiento y morfológicas en cempasúchil.

Sombreado, %	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de botones cerrados	Número de botones semiabiertos	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuela, cm
0	19.5±1.08 a	6.4±0.45 a	5.0±0.87 ab	1.6±0.91 a	2.8±0.65 a	3.96±0.11a
30	20.0±1.37 a	7.6±0.57 a	5.6±0.76 a	0.8±0.65 a	2.2±0.42 a	4.24±0.42 a
50	21.6±0.83 a	7.6±0.57 a	2.8±0.42 b	1.2±0.42 a	2.4±0.45a	4.40±0.16 a
70	22.5±1.09 a	7.0±0.35 a	4.0±0.94 ab	1.8±0.42 a	2.6±0.27 a	4.52±0.20 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

De manera similar a lo aquí obtenido, Rojas-Lara *et al.* (1999) reportan que en chile manzano a cuatro niveles de sombreado (90, 70, 50 y 30 %) y el testigo (0 % de sombreado), las plantas con 30 y 70 % de sombreado tuvieron un mejor desarrollo de sus estructuras vegetativas como diámetro de tallo, número de ramas de los vástagos y longitud de los mismos. Así también, Evangelista-Lozano *et al.* (2011) estudiaron la influencia de dos ambientes de luminosidad (con malla y sin malla) en el desarrollo de *T. erecta* midiéndola altura de la planta, número de botones florales y el diámetro de las cabezuelas; reportaron que las plantas más altas fueron aquellas expuestas bajo malla, también éstas presentaron mayor número de botones florales y de diámetro de las cabezuelas. Por el contrario, en *Capsicum annum*, la sombra induce incremento en la caída de flores, con su respectiva consecuencia negativa sobre el cuajado de frutos (Shifriss *et al.*, 1994). De la misma manera Schiappacasse *et al.* (2007) en liatris (*Liatris spicata*) bajo diferentes niveles de sombreado 35, 50, 65 y 80 % y un testigo sin sombra, concluyen que el uso de malla sombra afecta la calidad de flores, disminuyendo la

longitud de espiga y el diámetro de vara, por tanto no se recomienda el uso de mallas sombreadoras para su cultivo.

Oren-Shamir *et al.* (2001) en pitósporo manchado o variegado (*Pittosporum variegatum*) mencionan que el sombreado puede acelerar el crecimiento vegetativo, y en plantas de porte bajo se puede retrasar el crecimiento, por tanto el sombreado puede tener un efecto inverso; es decir, el efecto depende de la fase fenológica de la planta. Estos autores concluyen que es posible ejercer una influencia considerable sobre las cualidades de crecimiento y florecimiento de plantas ornamentales por medio del sombreado.

2.3.2. Variables fisiológicas

2.3.2.1. Biomasa seca

La acumulación de biomasa seca tuvo el orden: flores>hojas>tallos>raíces independiente del porcentaje de sombreado (**Figura 2.1**). El sombreado más alto de 70 % produjo menores pesos de biomasa seca en todos los órganos evaluados; la biomasa de flores, hojas, tallos y raíces de este tratamiento fue inferior en 54.29, 76.30, 64.77 y 64.71 %, respectivamente, que la registrada en el tratamiento sin sombreado. Por el contrario, en otra investigación realizada en lígulas de *T. erecta*, se observó que el peso seco de éstas fue menor en plantas sin malla en comparación con las que se desarrollaron con malla, donde las condiciones de intensidad lumínica excesivas llevaron a la planta a reducir su desarrollo vegetativo (Evangelista-Lozano *et al.*, 2011).

Es importante destacar que los resultados de diámetro de cabezuela (**Cuadro 2.6**) no se relacionan de manera positiva con la biomasa seca de éstas (**Figura 2.1**).

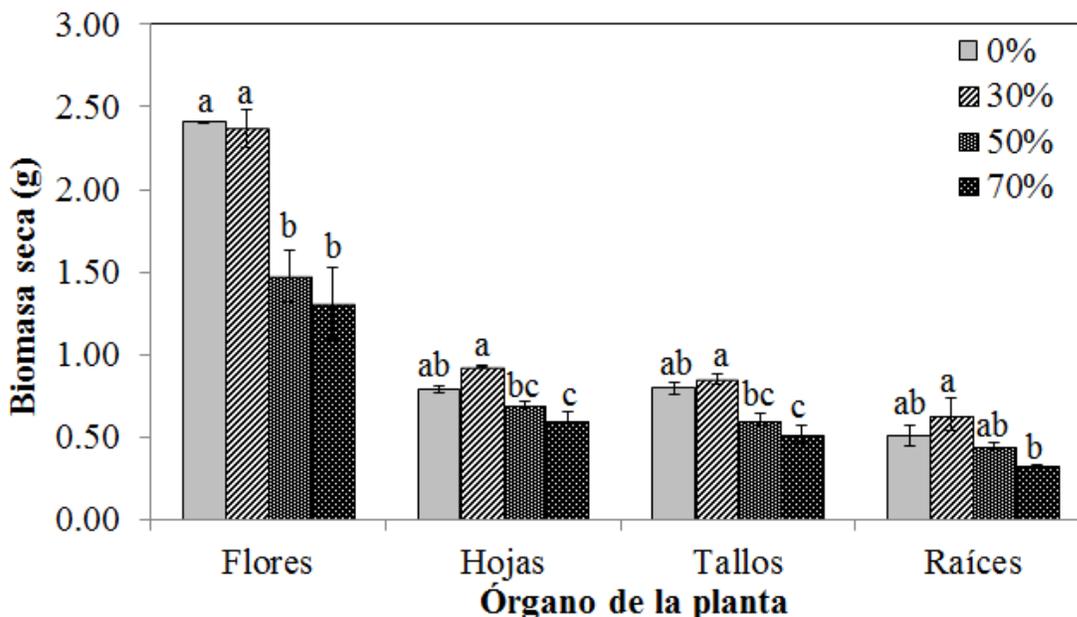


Figura 2.1 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con cuatro porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

De la misma manera, en un trabajo de Sánchez-Millán *et al.* (2006) las plantas que se desarrollaron en un invernadero de plástico el peso seco de las lígulas fue mayor que las que se desarrollaron en el invernadero de vidrio, dado que, en el plástico no estuvieron influenciadas directamente por la radiación. Un estudio similar a esta investigación es la realizada por Flores-López *et al.* (2008) quienes determinaron la influencia de cuatro niveles de sombreado de (30, 50 y 60 % de sombra y un testigo sin malla) en papa; concluyeron que a menor radiación disminuyó la eficiencia fotosintética de la planta, lo que repercutió directamente en la reducción de biomasa seca del vástago y del tubérculo. Por otro lado, en este estudio se observó una reducción significativa en la biomasa seca en hojas y raíces al igual que en cabezuelas, en comparación con el tratamiento testigo (sin sombreado) (**Figura 2.1**). De manera similar en un estudio con plántulas de estática y

viola producidas en túnel de plástico, con malla sombra de 50 % o a intemperie, se concluyó que tanto en el tratamiento a intemperie como bajo malla-sombra se registraron menores acumulaciones de biomasa seca en ambas especies (Ayala-Garay *et al.*, 2011). La raíz fue el órgano con menor variación en peso de biomasa seca; existiendo diferencias estadísticas significativas solo entre los tratamientos con sombreado de 30 y 70 %: el primer tratamiento fue superior que el segundo (**Figura 2.1**).

2.3.2.2. Concentración nutrimental

Algunos de los factores más comunes en el trópico, que producen estrés en las plantas ya sea por deficiencia o exceso, son el nitrógeno y la irradiación lumínica (Pérez-Asseff *et al.*, 2007).

La concentración foliar de N, P y K incrementó significativamente con el aumento en el nivel de sombreado; siendo los tratamientos con sombreado para los tres nutrientes diferentes desde el punto de vista estadístico al testigo. En cabezuelas se observó que la concentración del N se relacionó de manera positiva con el nivel de sombreado. Las concentraciones de P y K en cabezuelas, por el contrario, fueron mayores en sombreados medios (30 y 50 %). En tallos solo se observaron diferencias estadísticas significativas en la concentración de P; en donde las medias más altas se registraron con los sombreados de 50 y 70 %. En raíces, los niveles de sombreado no influyeron las concentraciones de N, P y K (**Cuadro 2.7**).

De manera general, e independiente del nivel de sombreado, el orden de concentración de N fue raíces>hojas>flores>tallos. En el caso de P, el orden de concentración fue hojas>flores>tallos>raíces. El orden de concentración de K fue flores>raíces>tallos>hojas.

Cuadro 2.7 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes porcentajes de sombreado.

Nutrimento	%	Órganos			
	Sombreado	Hojas	Flores	Tallos	Raíces
N	0	0.74±0.34 b	1.20±0.01 b	0.83±0.35 a	3.39±1.84 a
	30	2.46±0.02 b	1.78±0.14 a	1.28±0.01 a	0.99±0.47 a
	50	2.90±0.04 a	1.46±0.04 ab	0.94±0.41 a	3.10±1.90 a
	70	2.64±0.03 a	1.64±0.04 a	1.17±0.28 a	1.54±0.33 a
P	0	1.02±0.03 b	0.66±0.04 b	0.66±0.01 c	0.39±0.07 a
	30	1.26±0.10 ab	1.11±0.04 a	0.72±0.01 b	0.35±0.07 a
	50	1.38±0.07 a	1.17±0.02 a	0.84±0.02 a	0.48±0.01 a
	70	1.51±0.01 a	0.49±0.08 b	0.79±0.01 a	0.35±0.04 a
K	0	4.86±0.06 b	8.95±0.13 b	6.91±0.36 a	9.32±1.06 a
	30	5.06±0.13 b	11.19±0.51 a	7.81±0.21 a	9.25±1.06 a
	50	6.25±0.24 a	9.66±0.36 ab	8.45±0.64 a	10.81±0.60 a
	70	6.02±0.03 a	8.96±0.41 b	9.29±0.72 a	10.33±0.38 a

Medias \pm DE con letras distintas en cada columna por nutrimento, indican diferencias significativas (Tukey, $P \geq 0.05$) entre tratamientos.

2.3.2.3. Carotenoides totales en flores

Los carotenoides tienen dos funciones en las plantas; son responsables de la pigmentación y son disipadores del exceso de energía luminosa a través del ciclo de la zeaxantina (Hirschberg, 2001). En este estudio, las plantas testigo tuvieron una concentración de carotenoides que representa apenas el 58.89 % de la concentración registrada en el tratamiento con sombreado del 70 %; y el tratamiento sin sombreado tiene concentraciones significativamente menores en comparación a todos los tratamientos con sombreado (**Figura 2.2**). Este resultado coincide con el obtenido por Sánchez-Millán *et. al.* (2006), quienes estudiaron el efecto de la radiación fotosintéticamente activa en carotenoides de *T. erecta* en modelos *in vivo* e *in vitro*. En las condiciones *in vivo*; evaluaron dos ambientes de luz solar utilizando dos invernaderos,

uno con cobertura plástica y otro de vidrio, como resultado se obtuvo mayor concentración total de xantófilas en el invernadero con cubierta plástica que con el de vidrio. En ese estudio concluyeron que la cantidad y calidad de luz y el tiempo de exposición afecta la biosíntesis de carotenoides más que la estructura química de dichos compuestos. Del mismo modo en este experimento se apreció que a medida que el porcentaje de sombreado aumenta, la concentración de carotenoides totales también incrementa; por el contrario, mayor intensidad luminosa inhibe el proceso fotosintético y también la formación de carotenoides (**Figura 2.2**).

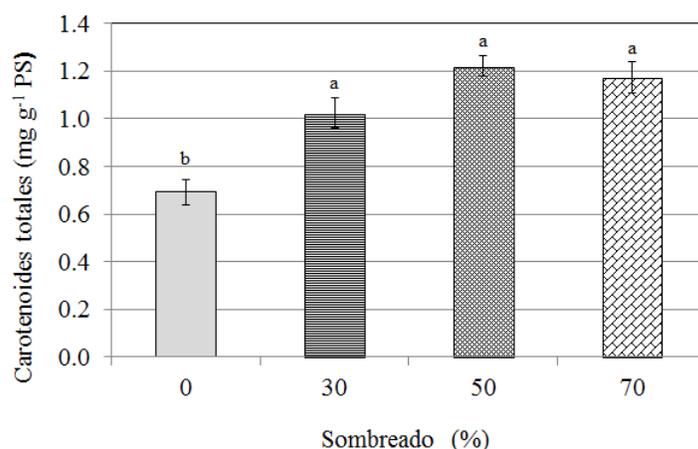


Figura 2.2 Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.

Evangelista-Lozano *et al.* (2011) evaluaron dos ambientes que diferían en la radiación fotosintéticamente activa (con malla del 50 % y sin malla), en el contenido de xantofilas totales en lígulas de *T. erecta*. Los resultados mostraron que en lígulas de plantas bajo malla se tuvo incremento en el contenido de xantofilas. Si bien en esta investigación no se

estudiaron las estructuras plastidarias, podría suponerse que en el tratamiento sin sombreado disminuyó la concentración de carotenos debido a cambios en plastidios que dañaron su ultraestructura. Por el contrario, en los porcentajes de sombreado más altos, la radiación fue menor y pudieron ser más estables los plastidios (menor variabilidad); así también la longitud de onda correspondió al espectro de excitación de los carotenoides favoreciendo su biosíntesis. De igual manera, Dymova y Golovko (2007), obtuvieron una disminución de pigmentos en plantas de *Ajuga reptans* en plena luz del sol en comparación con las plantas cultivadas en sombra, con este estudio concluyen que la luz afecta de manera negativa la biosíntesis de pigmentos.

2.3.2.4. Flavonoides totales en flores

Las condiciones climáticas como temperatura y radiación puede afectar la síntesis de estos compuestos (Klimov *et al.*, 2008). En este estudio, se evidencian efectos negativos del sombreado en la concentración de flavonoides totales en flor. El sombreado en porcentajes de 30, 50 y 70 % ocasionó reducciones significativas en la concentración de flavonoides totales éstos tratamientos fueron inferiores al testigo en 82.53, 85.28 y 85.27 %, respectivamente (**Figura 2.3**) Estos resultados concuerdan con los de Karimi *et al.* (2013) quienes al evaluar el efecto de dos intensidades luminosas en la acumulación y concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas, tallos y raíces de tres variedades *Labisia pumila*, mostraron que a mayor intensidad luminosa se presentó la mayor acumulación de flavonoides totales en hojas.

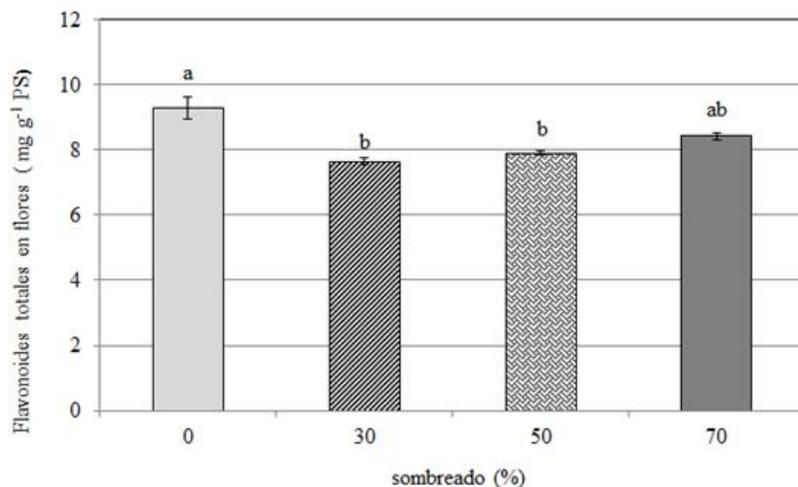


Figura 2.3 Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS=peso seco.

Kumari *et al.* (2009), reportaron que la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), es importante en la biosíntesis de ácidos fenólicos y que la actividad de ésta aumenta al ser inducida por alta intensidad de luz, concluyendo que el incremento en la producción de compuestos /fenólicos podría estar relacionado con esta enzima, lo cual pudo haber sucedido en el presente estudio en el tratamiento sin sombreado al mostrar una mayor concentración de flavonoides totales. Según Warren *et al.* (2003), al incrementar la luz aumenta la intensidad de fotosintatos primarios, lo que conduce a un incremento de la concentración fenólica en la planta.

2.3.2.5. Aceites esenciales por órganos

Los tiempos de retención de los compuestos de aceites esenciales identificados en hojas, flores, tallos y raíces se presentan en el **Cuadro2.8**. La técnica GS/MS permitió identificar

20 compuestos diferentes en los distintos órganos de la planta de *T. erecta* var. Inca (Figura 2.4).

En *Tagetes parryi* en una muestra combinada de hojas, tallos e inflorescencias se identificó una gran variedad de compuestos (Díaz-Cedillo y Serrato-Cruz, 2011), coincidiendo solo en uno con lo aquí observado, el eugenol. En *Tagetes minuta* identificaron mirceno, limoneno, eugenol y spatulenol (Gil *et al.*, 2000); los compuestos antes mencionados coinciden con los aquí reportados; los compuestos germacreno y limoneno han sido reportados en *Tagetes argentina* (Vázquez *et al.*, 2011).

Cuadro 2.8 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de campasúchil tratadas con diferentes porcentajes de sombreado.

Compuesto	Tiempo de retención, min	Compuesto	Tiempo de retención, min
Cariofileno	19.47	β -Farneseno	20.04
D-Limoneno	12.21	Germacreno	20.95
Ocimeno	12.59	γ -Elemeno	21.27
Piperitona	16.5	Óxido de cariofileno	23.2
Sabineno	10.94	Trans-pineno	26.95
Spathulenol	23.25	Eugenol	
β -Mirceno	11.36	Bergamoteno	20.88
β -Felandreno	10.94	Cicloisositiveno	18.32
α -Pineno	9.93	β -Sesquifelandreno	21.8
Terpinoleno	13.4	Bisaboleno	21.4

Las condiciones de luz pueden promover el crecimiento y desarrollo de plantas y contribuir a incrementar la producción de aceites esenciales de especies medicinales y aromáticas cultivadas comercialmente (Ferreira-Fernandes *et al.*, 2013).

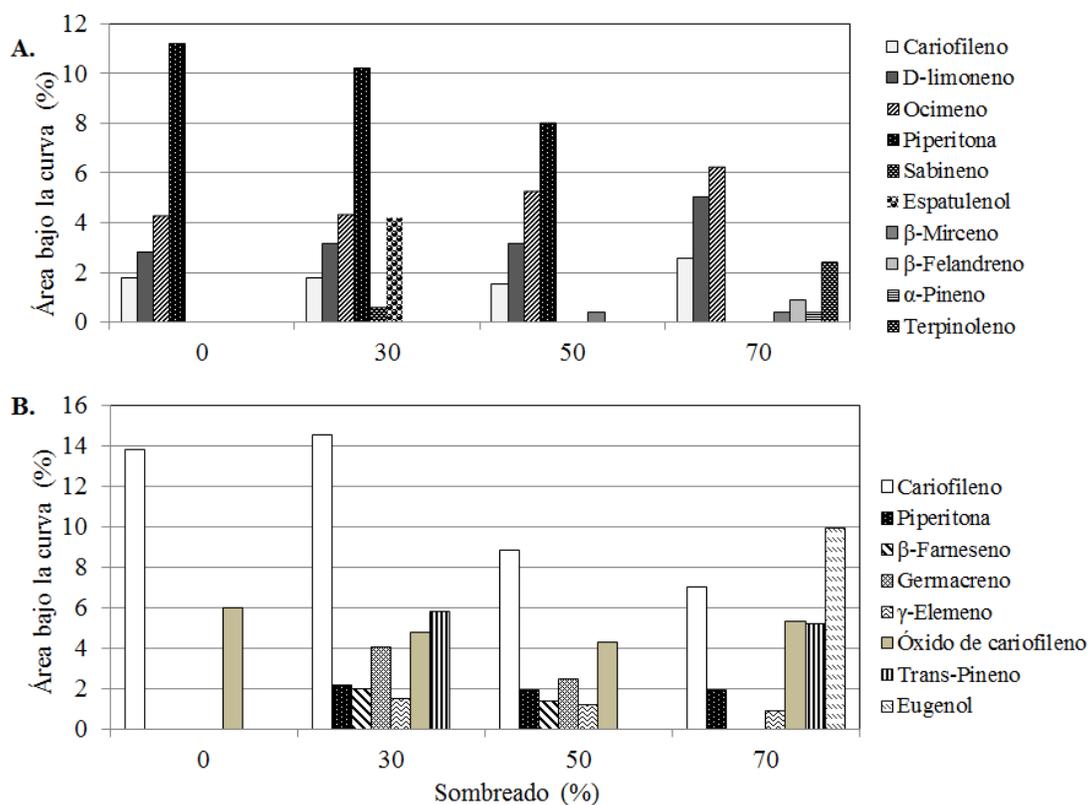


Figura 2.4 Aceites esenciales identificados en hojas (A) y flores (B) de plantas de campasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración.

El número de compuestos en aceites esenciales de hojas fue variable, así también su abundancia; resulta pertinente destacar que este órgano presentó el mayor número de compuestos en comparación con el resto y la abundancia relativa de éstos oscila de 87 a 99 %. En la **Figura 2.4A** se muestra que los compuestos presentes de manera consistente, de manera independiente al tratamiento de sombreado son: cariofileno, D-limoneno y ocimeno, con áreas bajo la curva similares. El compuesto que se presentó en hojas en mayor abundancia con porcentajes de sombreado de 0, 30 y 50 % fue piperitona, siendo más abundante en hojas de plantas sin sombreado con un área bajo la curva de

11.2 %. En el tratamiento consistente en sombreado a 70 % se registró el mayor número de compuestos, presentando en forma única β -mirceno, β -felandreno, α -pineno y terpinoleno (**Figura 2.4A**).

En aceite proveniente de flores, se identificó de manera coincidente con hojas cariofileno y piperitona, el resto de los componentes fueron diferentes como β -farneseno, germacreno, γ -elemeno, óxido de cariofileno, trans-pineno y eugenol (**Figura 2.4B**). Con sombreado del 30 % el compuesto que presentó mayor área bajo la curva fue el cariofileno con un valor de 14.53 %, de igual manera en este tratamiento se presentó el mayor número de compuestos en comparación con el resto de los tratamientos y el menor número de compuestos fue en tratamiento sin sombreado, identificándose solo cariofileno y óxido de cariofileno. Estos resultados coinciden con Souza *et al.* (2010), quienes evaluaron tres niveles de sombreado (30, 50 y 70 %) y pleno sol en *Pothomorphe umbellata*, y su relación con la composición de aceites esenciales. Estos autores concluyeron que con el sombreado de 30 % se identificaron el mayor número de compuestos. Así mismo, en un estudio con *Salvia sclarea* L. al evaluar cuatro niveles de sombreado (0, 25, 50 y 75 %), reportaron que solo con 50 % de sombreado encontraron germacreno (Kumar *et al.*, 2013). En aceite de clavo, los compuestos eugenol y cariofileno son los más importantes dado que actúan como supresores de malezas; la luz tiene efectos opuestos en éstos, en el eugenol disminuye su síntesis y en el cariofileno aumenta su concentración con el incremento de la intensidad luminosa (Stoklosa *et al.*, 2012). De la misma manera, Ferreira-Fernandes *et al.* (2013) evaluaron cuatro ambientes de luz (4, 7, 11 y 20 mol m²d⁻¹), en albahaca de clavo (*Ocimum gratissimum* L.); identificando respuestas diferenciales de la cantidad de luz en la composición de los aceites. Por un lado, cariofileno y óxido de cariofileno se identifican cuando se incrementan las intensidades de luz; por otro lado, eugenol y germacreno se detectan a

bajas intensidades de luz. En esta investigación, solo en cabezuelas sometidas a 70 % de sombreado (menor intensidad luminosa) se observó presencia de eugenol. En la planta conocida como bolita prieta (*Varronia curassavica* Jacq.) bajo diferentes intensidades luminosas (20, 50, 70 y 100 %) detectan óxido de cariofileno, trans-cariofileno y α -pineno, estos son compuestos principales de esta especie, también identifican γ -elemeno, germacreno y spathulenol (Feijó *et al.*, 2014). Esta variedad de aceites pudiera ser debido a que en la especie *V. curassavica*, el aceite esencial se secreta y almacena en tricomas presentes en el haz de la hoja y el desarrollo de éstos puede ser influenciado por las diferentes intensidades luminosas.

En tallos, el número de compuestos identificados en el aceite esencial fue menor que en hojas y flores. Con sombreado de 50 % se forma el mayor número de compuestos (cuatro); mismos que también se identificaron en hojas y cabezuelas, siendo éstos cariofileno, D-limoneno, farneseno y piperitona, este último compuesto con mayor área bajo la curva. En tallos de plantas tratadas con sombreados de 30 y 70 % se observó solo un componente en cada caso, piperitona y D-limoneno, respectivamente (**Figura 2.5A**).

En raíces se identificaron siete compuestos en total (**Figura 2.5B**); de los cuales, bergamoteno, cicloisativeno, β -sesquifelandreno y bisaboleno fueron identificados solo en este órgano. Con el porcentaje de sombreado de 50 % se tuvo el mayor número de compuestos (cariofileno, piperitona, bergamoteno, cicloisativeno y β -sesquifelandreno), aunque en menor área. En el tratamiento consistente en 70 % de sombreado, las raíces tuvieron menor número de compuestos, cariofileno y β -farneseno. En el tratamiento sin sombreado el β -farneseno se presentó en mayor área bajo la curva, con un valor de 20.88 % (**Figura 2.5B**).

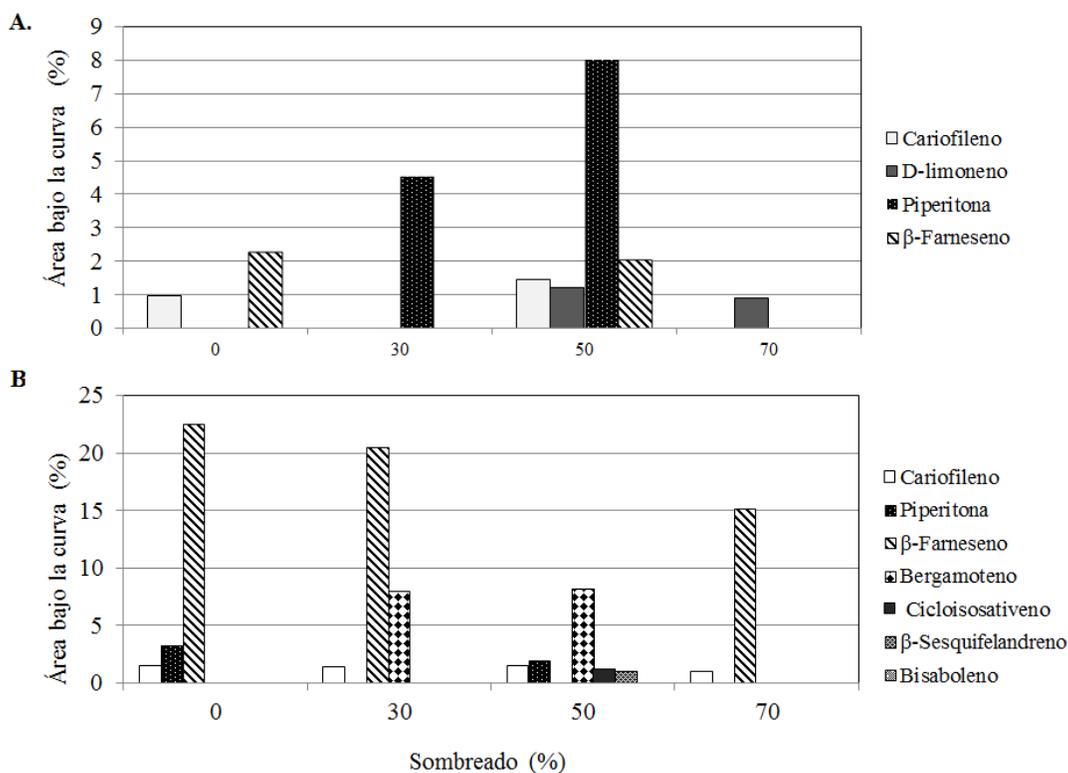


Figura 2.5 Aceites esenciales identificados en tallos (A) y raíces (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 38 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración.

2.3.2.6. Concentración de clorofilas

De manera general en los tratamientos con sombreado se incrementó significativamente la concentración de clorofila a, b y total en hojas (**Figura 2.6**). Las plantas testigo tuvieron concentraciones de clorofila a, b y total que representa sólo el 58.17, 59.17 y 58.58 %, de las concentraciones registradas en plantas tratadas con un porcentaje de sombreado de 70, respectivamente. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Casierra-Posada *et al.* (2012), estudiando plantas de caléndula cultivadas a plena exposición y bajo malla del 37 % de reducción de luz, la relación de las clorofilas a/b fue mayor en hojas de caléndula colocadas bajo sombra, en comparación con las hojas de plantas bajo plena exposición.

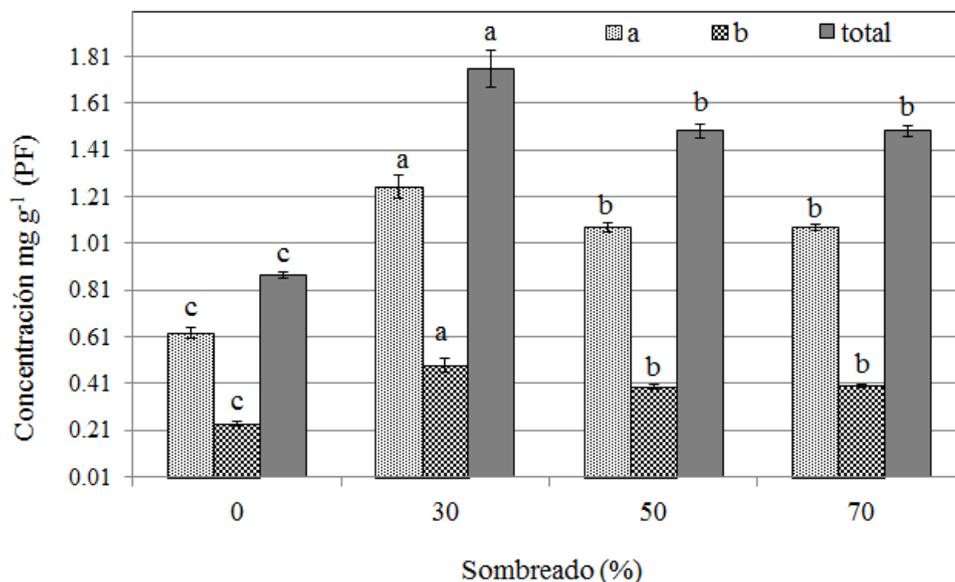


Figura 2.6 Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

De la misma manera, en un estudio con plantas de vainilla cultivadas con tutores artificiales en casa sombra que proporciona el 70 % de reducción de luz, y plantas cultivadas con tutores naturales sin sombreado, los resultados indican que el sistema de cultivo con malla sombra presenta el mayor contenido de clorofila (Elorza-Martínez *et al.*, 2007).

2.3.2.7. Azúcares totales en hojas y flores

Las concentraciones de azúcares totales en hojas y flores de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes niveles de sombreado se presentan en la **Figura 2.7**. En hojas de plantas sometidas a porcentajes de sombreado de 50 y 70, se observan incrementos

significativos en la concentración de azúcar en comparación con el resto de los tratamientos (**Figura 2.7A**). Si bien en flores los tratamientos de sombreado no influyeron en la concentración de azúcares, se observan concentraciones ligeramente superiores en los tratamientos con mayor sombreado (50 y 70 %); es decir, se tuvo la misma tendencia que en hojas (**Figura 2.7B**). Las hojas y flores de plantas testigo (sin sombreado) tienen valores de concentración de azúcares inferiores en 92.24 y 92.06 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento de sombreado a 70 %. Contrario a lo aquí obtenido, Páez *et al.* (2007), reportan que la radiación más baja (30 % de la radiación total) redujo la concentración de carbohidratos solubles en hojas de verdolaga al 18 %, en comparación con las plantas que crecieron bajo luz total (100 %). Por otra parte, Watson *et al.* (2002) mencionan que diferentes niveles de sombreado (0, 25 y 47 %) tuvieron un efecto significativo en las concentraciones de glucosa y sacarosa en plantas de fresa. Las concentraciones de sacarosa en la fruta mostraron diferencia significativa entre el control (0.7 %) y el tratamiento consistente en 47 % de sombreado (0.1 %) en todas las fechas de cosecha. En general la concentración de azúcares es inversamente proporcional al nivel de sombreado.

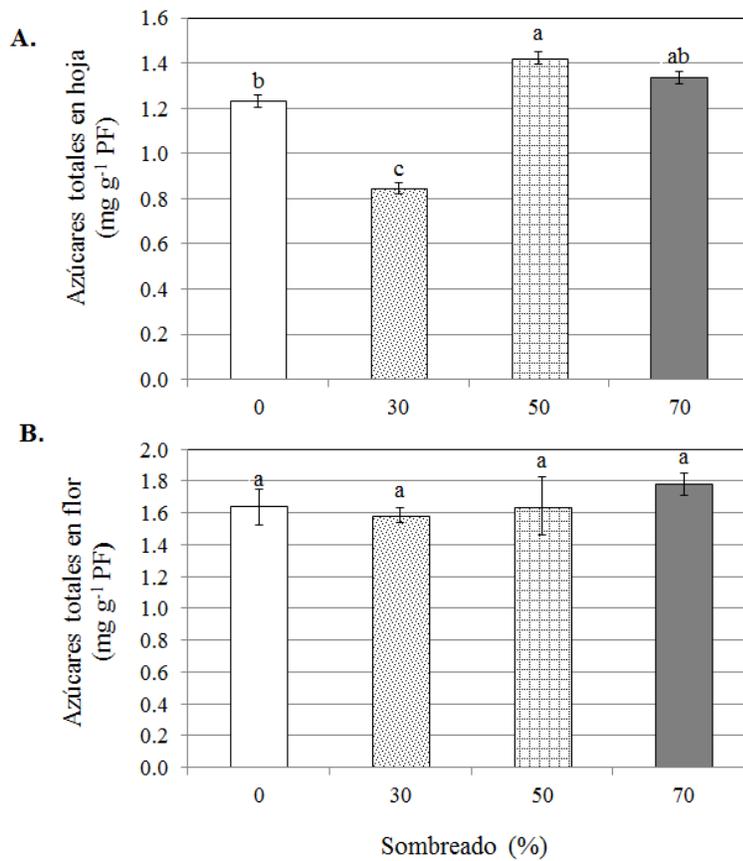


Figura 2.7 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración por 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

2.3.2.8. Aminoácidos libres totales en hojas y flores

Sin sombreado y con un nivel de éste de 30 % se tuvieron las mayores concentraciones foliares de aminoácidos; con el sombreado a nivel de 30, 50 y 70 % la concentraciones de aminoácidos fueron inferiores al testigo en 97.89, 38.02 y 61.54 %, respectivamente (**Figura 2.8A**). Por otro lado, en flores, la concentración de aminoácidos libres totales fue significativamente superior en el tratamiento con sombreado de 50 % (**Figura 2.8B**).

En este estudio también es evidente que los distintos niveles de sombreado tuvieron efectos opuestos en hojas y flores. De manera similar a los resultados aquí obtenidos en hojas, Khaleafa *et al.* (1982) en el alga *Caulerpa prolifera* mencionan que al exponerla a intensidades de luz bajas, los contenidos de aminoácidos libres fueron mayores en comparación con los conjugados a excepción de fenilalanina y leucina; caso contrario, a intensidades altas de luz los conjugados fueron mayores que los libres excepto arginina, glicina y tirosina.

Por otro lado, Durzan (2010) en abetos blancos tolerantes a la sombra que crecieron en 100, 45, 25 y 13 % de luz natural durante cuatro años, observa que la arginina contribuye a la latencia invernal y se incrementa con el sombreado.

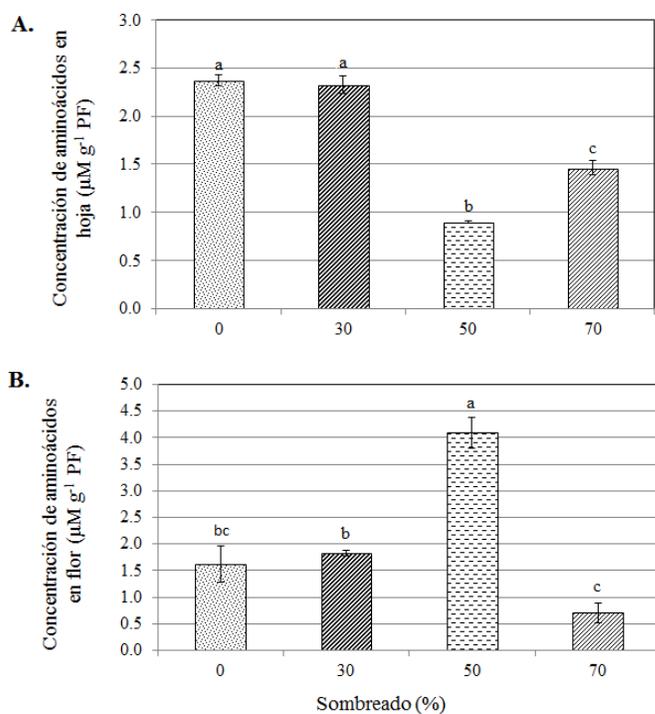


Figura 2.8 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 40 días condiferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

2.3.2.9. Proteínas solubles totales en hojas y flores

Hojas de plantas de los tratamientos con sombreado de 30, 50 y 70 % tuvieron concentraciones de proteínas inferiores a aquellas registradas en el tratamiento testigo; no obstante, solo existieron diferencias estadísticas significativas entre el testigo y el sombreado de 50 % (**Figura 2.9A**).

En flores no existieron diferencias significativas en la concentración de proteínas por efecto del nivel de sombreado; sin embargo (**Figura 2.9B**).

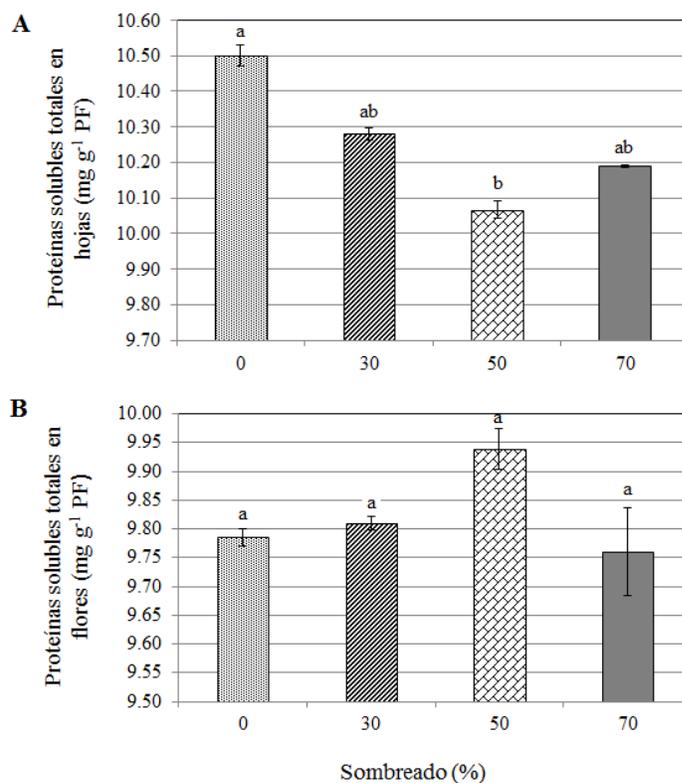


Figura 2.9 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

Eckardt *et al.* (1997) evaluaron el contenido de proteínas en plantas tipo silvestre y plantas mutantes con reducida ribulosa fosfato carboxilasa/oxigenasa activasa (RUBISCO

activasa) de *Arabidopsis thaliana*, bajo dos condiciones de iluminación, alta ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y baja ($200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Estos autores concluyen que en ambos tipos de plantas, la baja luminosidad redujo significativamente el contenido de proteínas.

De igual manera, en cianobacterias del género *Anabaena* se han evaluado la irradiancia a 78, 156 y $238 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, concluyendo que este factor ejerce influencia en el contenido de proteínas siendo el mayor contenido a $156 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Loreto *et al.*, 2003).

2.4. CONCLUSIONES

La luminosidad afecta de manera diferencial el desarrollo morfológico de cempasúchil.

La concentración de carotenoides, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales y proteínas solubles totales en flores fue superior con sombreado del 50 %.

El tratamiento sin sombreado incrementó la biomasa seca, y la concentración de flavonoides en flores; y en hojas, los aminoácidos libres totales y proteínas solubles totales.

La luminosidad afectó de manera diferencial las concentraciones de N, P y K en los órganos analizados. En hoja se observaron relaciones positivas entre concentración y el nivel de sombreado; en flores, de manera general se registraron mayores concentraciones con el sombreado de 30 %; en tallos, se incrementan concentraciones de P y K con el aumento en el nivel de sombreado; en raíces no hay tendencias que se relacionen con los tratamientos de sombreado evaluados.

Por otra parte, se identificaron un total de 20 compuestos en los diferentes órganos de la planta. El mayor número de compuestos se presentó en hojas en el sombreado de 70 %, seguido de flores en el 30 % de sombreado, mientras que en tallos y raíces, el mayor número de compuestos se tuvo con sombreado de 50 %.

La concentración de clorofilas a, b y total fue superior con el sombreado de 30 %.

Por lo anterior se concluye que, la variedad Inca de *Tagetes erecta* puede ser una opción para desarrollarse en distintas intensidades luminosas, según la finalidad de la producción.

2.5. LITERATURA CITADA

- Alcántar GG, Sandoval VM. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial. Núm. 10. SMCS. Chapingo, México. 150 p.
- Ayala-Garay J, Carrillo-Salazar JA, Hernández-García E, Díaz-Martínez E, Livera-Muñoz M, Almaguer-Vargas G. 2011. Crecimiento de plántulas de estátice (*Limonium sinuatum*) y viola (*Viola cornuta*) en ambientes contrastantes. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(2): 129-140.
- Ayala-Tafoya F, Zatarin-López DM, Valenzuela-López M, Partida-Ruvalcaba L, Velázquez-Alcaraz T de J, Díaz-Valdés, Osuma-Sánchez JA. 2011. Crecimiento y rendimiento de tomate en respuesta a la radiación transmitida por mallas sombra. Terra Latinoamericana 29:403-410.
- Bremner MJ. 1965. Total nitrogen. In: Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9. Black, C.A. (ed). Pp. 1149-1178. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA.
- Briskin DP, Gawienowski LA. 2001. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Perforatum*. Plant Physiol. Biochem. 39: 1075-1081.
- Caldari JP. 2007. Manejo de la luz en invernaderos. Los beneficios de luz de calidad en el cultivo de hortalizas. I Simposio Internacional de Invernaderos. México.
- Casierra-Posada F, Ávila-León OF, Riascos-Ortíz DH. 2012. Cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. Temas Agrarios 17(1): 60-71.
- Casierra-Posada F. 2007. Efecto del estrés por sombra sobre la producción en plantas de limonio (*Limonium* sp. CV. Bluestream). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 1(2):236-245.
- Chen M, Chory J, Fankhauser. 2004. Light signal transduction in higher plants. Annu. Rev. Genet. 38: 87-117.
- Díaz-Cedillo F, Serrato-Cruz MA. 2011. Composición del aceite esencial de *Tagetes parryi* a. gray. Rev. Fitotec. Mex. 34(2):145-148.
- Durzan DJ. 2010. Arginine and the shade tolerance of White spruce saplings entering winter dormancy. Journal of Forest Science 56(2): 77-83.
- Dymova OV, Golovko TK. 2007. Pigment apparatus in *Ajuga reptans* plants as affected by adaptation to light growth conditions. Russian Journal of Plant Physiology 54(1): 39-45.
- Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. African Journal of Biotechnology 7(18): 3188-3192.
- Eckardt NA, Snyder GW, Portis AR, Ogren WL. 1997. Growth and photosynthesis under high and low irradiance of *Arabidopsis thaliana* antisense mutants with reduced Ribulosa-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase content. Plant Physiol. 113: 575-586.
- Elorza-Martínez P, López-Herrera M, Hernández-Fuentes AD, Olmedo-Pérez G, Domínguez-Barradas C, Maruri-García JM. 2007. Efecto del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (*Vainilla planifolia* Andrewz) en Tuxpan, Veracruz, México. Revista UDO Agrícola 7(1): 228-236.
- Evangelista-Lozano S, Ubaldo-Suárez D, Camacho-Díaz BH, Arenas-Ocampo ML, Del Villar-Martínez AA, García-Jiménez F, Jiménez-Aparicio A. 2011. Estudio del Desarrollo, Calidad de planta y acumulación de pigmentos en lígulas de *Tagetes erecta* L. expuestas a dos

- intensidades de luz. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10(5): 476-488.
- Feijó da SEVR, de Oliveira RA, do BCL. 2014. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. Brazilian Journal of Pharmacognosy 24: 516-523.
- Ferreira-Fernandes V, de Almeida LB, Feijó EVRS, Silva DC, de Oliveira RA, Mielke MS, Costa LCB. 2013. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. Brazilian Journal of Pharmacognosy 23(3): 419-424.
- Flores-López R, Sánchez-del Castillo F, Rodríguez-Pérez JE, Mora-Aguilar R, Colinas-León MT, Lozoya-Saldaña, H. 2008. Influencia de la radiación solar en la producción de semilla-tubérculo de papa bajo cultivo sin suelo. Revista Chapingo Serie Horticultura 15(1): 25-30.
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. Plant Cell Environ. 21: 253-268.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak. J. Pharm. Sci. 22(3): 227-281.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A, Wahab PEM, Halim MRA. 2010. Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). International Journal of Molecular Sciences 11(10): 3885-3897.
- Gil A, Ghera CM, Leicach S. 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. Biochemical Systematics and Ecology 28: 261-274.
- Harbone JB. 1973. Chlorophyll extraction. In: Harbone JB. (ed.). Phytochemical Methods. Recommended technique. Chapman and Hall, London. pp. 205-207.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Curr. Opin. Plant Biol. 4:210-218.
- Höfner R, Vásquez-Moreno L, Abou-Mandour AA, Bohnert HJ, Schmitt JM. 1989. Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol. Biochem. 27: 803-810.
- Jiao Y, Lau OS, Wang DX. 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. Nature Reviews Genetics 8: 217-230.
- Juárez-López P, Bugarín-Montoya R, Castro-Brindis R, Sánchez-Monteón AL, Cruz-Crespo E, Juárez-Rosete CR, Alejo-Santiago G, Balois-Morales R. 2011. Estructuras utilizadas en la agricultura protegida. Revista Fuente 3(8): 21-27.
- Karimi E, Jaafar HZE, Ghasemzadeh A, Ibrahim MH. 2013. Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth. Australian Journal of Crop Science 7(7): 1016-1023.
- Keller P, Lüttge, U. 2005. Photosynthetic light-use by three bromeliads originating from shaded sites (*Ananas ananassoides*, *Ananas comosus* cv. Panare) and exposed sites (*Pitcairnia pruinosa*) in the medium Orinoco basin, Venezuela. Biol. Plant. 49:73-79.
- Khaleafa AF, Mohsen AF, Shaalan SH. 1982. Effect of different light intensities on growth, amino acid, fat and sugar concentrations in *Caulerpa prolifera* (Foerskal) Lamouroux. Hydrobiological Bulletin 16(2-3): 207-212.
- Klimov SV, Burakhanova EA, Dubinina IM, Alieva GP, Sal'nikova EB, Olenichenko NA, Zagosquina NV, Trunova TI. 2008. Suppression of the source activity affects carbon distribution and frost hardiness of vegetating winter wheat plant. Russ. J. Plant Physiol. 55: 308-314.
- Kumar R, Sharma S, Pathania V. 2013. Effect of shading and plant density on growth, yield and oil composition of clary sage (*Salvia sclares* L.) in North Western Himalaya. The Journal of Essential Oil Research 25(1): 23-32.
- Kumar, R.; Sharma, S.; Singh, B. 2011. Influence of transplanting time on growth, essential oil yield and composition in clary sage (*Salvia sclarea* L.) plants grows under mid hills of north-western Himalayas. J. Essen. Oil Bearing Pl. 14: 260-265.
- Kumari H, Singh S, Agrawal SB. 2009. Effects of supplemental ultraviolet-B radiation on growth and physiology of *Acorus calamus* L. (sweet flag). Acta Biol. Cracov Ser. Bot. 51: 19-27.

- Kurata H, Matsumura S, Furusaki S. 1997. Light irradiation causes physiological and metabolic changes for purine alkaloid production by *Coffea arabica* cells. *Plant Sci.* 123: 197-203.
- Li Y, Craker LE, Potter T. 1996. Effect of light level on essential oil of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). *Acta Horticultrae* 426: 419-426.
- Loreto C, Rosales N, Bermúdez J, Morales E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria Anabaena PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Bot.* 60(2): 83-89.
- Marchese JA, Mattana RS, Ming LC, Broetto F, Vendramini PF, Moraes RM. 2008. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.) plants. *Photosynthetica* 46(4): 501-505.
- Moore S, Stein W.H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211: 893-906.
- Nagata M, Yamashita I. 2002. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish.* 39: 925-928.
- Nanyonga SK, Opoku AR, Lewu FB, Oyedeji OO, Singh M, Oyedeji AO. 2013. Antioxidant activity and cytotoxicity of the leaf and bark extracts of *Tarchonanthus camphorates*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 377-383.
- Oren-Shamir M, Gussakovsky EE, Shpiegel E, Nissim-Levi A, Ratner K, Ovadia R, Giller YE, Shahak Y. 2001. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *pittosporum variegatum*. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76:353-361.
- Paez A, Gebre GM, Gonzalez ME, Tschaplinski TJ. 2000. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. *Environmental and Experimental Botany* 44: 133-139.
- Páez A, Páez PM, González ME, Vera A, Ringelberg D, Tschaplinski TJ. 2007. Crecimiento, carbohidratos solubles y ácidos grasos de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) sometida a tres niveles de radiación. *Rev. Fac. Agron. (Luz).* 24:642-660.
- Pérez-Asseff JM, Peña-Salamanda EJ, Torres-González C. 2007. Efecto del nitrógeno y la irradiación en la eficiencia fotosintética del anamú *Petiveria alliacea* (Phytoloccaceae). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 31(118): 49-55.
- Rojas-Lara PC, Colinas-León MT, Pérez-Grajales M, Sahagún-Castellanos J. 1999. Influencia del sombreado en el comportamiento vegetativo y reproductivo del chile manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz, López y Pavón). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5(1): 9-13.
- Sánchez-Millán JL, Arreguín-Espinosa R, Barradas VL, Anaya-Lang AL, García-Jiménez FA. 2006. Efecto de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) en carotenoides en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *In: XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.* Guanajuato, Gto., México. 120 p.
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schiappacasse F, Carrasco SG, Carrasco CF. 2007 Efecto de cuatro niveles de sombreado sobre la calidad de vara floral y cormo de liatris (*Liatris spicata*). *Agricultura Técnica* 67(1): 100-104.
- Shifriss C, Pilowsky M, Aloni B. 1994. Variation in flower abscission of peppers under stress shading conditions. *Euphytica* 78:133-136.
- Southgate DA. 1976. Determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers. LTD. London. 105 p.
- Souza MR, Ribero VMA, Marchese JA, Chau ML, Ortiz MMM. 2010. Shade level effects on yield and chemical composition of the leaf essential oil of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel. *Sci. Agri. Piracicaba, Braz.* 67(4):414-418.
- Steiner A. 1984. The universal nutrient solution. *In: I. S. O. S. C. Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture, The Netherlands.* pp. 633-649.

- Stoklosa A, Matraszek R, Isman MB, Up adhyaya M. 2012. Phytotoxic activity of clove oil, its constituents, and its modification by light intensity in broccoli and common lambsquarters (*Chenopodium album*). *Weed Science* 60: 607-611.
- Tadeo FR, Gómez-Cárdenas A. 2008. Fisiología de las plantas y el estrés. In: Azcón-Bieto J, Talón M. (eds.). *Fundamento de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. pp. 577-597.
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Editor Universitat Jaume I. 1338 p.
- Trejo-Téllez LI, Peralta-Sánchez MG, Gómez-Merino FC, Rodríguez-Mendoza MN, Serrato-Cruz MA, Arévalo-Becerril AE. 2013. Cloruro de sodio sobre biomasa seca y absorción de cationes macronutrientes en cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 979-990.
- Ubaldo-Suárez D. 2007. Efecto de la luz en el desarrollo y en la acumulación de carotenoides en lígulas de *Tagetes erecta* L. Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. 89p.
- Vázquez AM, Aimar ML, Demmel GI, Criado SG, Ruiz GM, Cantero JJ, Rossi LI, Velasco MI. 2011. Determination of volatile organic compounds of *Tagetes argentina* Cabrera (Asteraceae) using HS-SPME analysis. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(5): 463-469.
- Warren MJ, Bassman J, Fellman JK, Mattinson DS, Eigenbrode S. 2003. Ultraviolet-B radiation of *Populus trichocarpata* leaves. *Tree Physiol* 23: 527-535.
- Watson R, Wrigth CJ, McBurney T, Taylor AJ, Linforth RST. 2002. Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavor compounds. *Journal of Experimental Botany* 53(377): 2121-2129.

CAPÍTULO III. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS, MORFOLÓGICAS, Y DE CALIDAD DE *Tagetes erecta* Linn., A LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA

3.1. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de plantas (Scott, 2008). Este elemento se encuentra en moléculas como: purinas, pirimidinas, porfirinas y coenzimas. Las purinas y pirimidinas se encuentran en los ácidos nucleicos ARN y ADN, que son esenciales para la síntesis de proteínas (Bijimol y Sing, 2001; Said-Al *et al.*, 2009). La estructura de la porfirina se encuentra en compuestos metabólicamente como los pigmentos de la clorofila y los citocromos, importantes en fotosíntesis y respiración. Las coenzimas son esenciales para la función de muchas enzimas. Este macronutriente es requerido para la síntesis de enzimas y su deficiencia afecta negativamente el metabolismo vegetal.

Las fuentes básicas de nitrógeno absorbidas por las plantas incluye formas inorgánicas (nitrato y amonio) y orgánicas (urea y aminoácidos), pero la respuesta a una forma particular de nitrógeno varía según la especie.

La asimilación de nitrógeno requiere la reducción de nitrato a amonio, seguido por asimilación en aminoácidos (Masclaux *et al.*, 2010). El uso de nitrógeno por las plantas involucra varios pasos, incluyendo absorción, asimilación, translocación y, cuando la planta envejece reciclamiento y removilización.

Por otra parte, las plantas requieren grandes cantidades de nitrógeno. Este elemento se relaciona con hasta el 50 % de la biomasa vegetal en base seca (Gliessman, 2002). Dependiendo de la especie, la etapa de desarrollo y órgano de la planta, la concentración de nitrógeno en tejido foliar varía entre 2 y 5 % del peso de la materia seca (Marschner, 2005). Guadarrama-Quiróz *et al.* (2007) mencionan que la aplicación de nitrógeno

incrementa la acumulación de materia seca en cada órgano de la planta y la biomasa total, pero no afecta la distribución de materia seca en cada estructura.

En diversas investigaciones se ha reportado que la nutrición modifica, tanto en forma positiva como negativa, el contenido y composición química de los metabolitos secundarios terpenos (carotenoides), los cuales además de su función como precursores de la vitamina A, tienen otras actividades biológicas como la actividad antioxidante (Toledo *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos (fenoles, flavonoides) están asociados con el color, características sensoriales (sabor y astringencia), características nutrimentales y propiedades antioxidantes (Kähkönen *et al.*, 2001). Los estudios sobre estos metabolitos se han enfocado a la evaluación de distintas concentraciones nutrimentales, diferentes fuentes de nutrimentos, o ambos, pero los mecanismos de acción de los nutrimentos en los resultados obtenidos hasta el momento no han sido abordados en detalle. En este sentido, Khalid (2013), reporta que la nutrición de la planta es uno de los factores más importantes que incrementan la producción de aceites esenciales. Condiciones de limitación de nitrógeno aumentan la producción de compuestos volátiles en plantas anuales (Said-Al *et al.*, 2009). Los efectos de la fertilización nitrogenada sobre crecimiento y composición de aceites esenciales en diferentes especies han sido reportados previamente en plantas aromáticas (Baranauskiene *et al.*, 2003; Asharaf *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005; Sifola y Barbieri, 2006; Martins *et al.*, 2007). Del mismo modo la biofertilización y la fertilización mineral en plantas aromáticas es un factor importante que determina el cultivo de la cantidad y calidad del aceite esencial (Nurzynska-Wierdak, 2013).

Por otra parte la actividad antioxidante de algunos aceites esenciales es valiosa (Baj *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2011), debido a su importancia en la industria farmacéutica, cosmética y la producción de alimentos.

En un experimento realizado en suelo, Omidbaigi *et al.* (2008) reportan incrementos significativos en la biomasa, contenido y porcentajes de los constituyentes del aceite esencial de *Tagetes minuta*, cuando se fertilizó con N a una dosis de 200 kg ha⁻¹, en comparación con dosis menores y en ausencia de fertilización nitrogenada. Por otra parte Singh *et al.* (2008) indicaron también en *T. minuta*, que la aplicación de nitrógeno conduce a un incremento lineal de la biomasa y de la producción de aceites esenciales, reportando como nivel óptimo de fertilización con N, 150 kg ha⁻¹, dosis con la cual se supera el rendimiento de aceites obtenido con dosis nitrogenadas de 0, 50 y 100 kg ha⁻¹, en 142, 49, y 23 %. Al incrementar la dosis de NPK, aumenta el contenido de aceites esenciales en *Tagetes patula*, pero solo en algunos períodos de cosecha (Stojanova *et al.*, 2000).

En tomillo, obtuvieron un efecto negativo con las dosis más altas de N (> 90 kg ha⁻¹) sobre la concentración de carotenos durante la segunda cosecha de evaluación (Baranauskiene *et al.*, 2003). Kopsell *et al.* (2007) en col mostró incrementos en luteína y β-caroteno al incrementar las dosis de N. En perejil se reportó el mismo comportamiento ya que los niveles de luteína, zeaxantina y β-caroteno aumentaron en respuesta a la aplicación de N (Chenard *et al.*, 2005). Así mismo, con dosis de 200 kg N ha⁻¹, las flores de *Lavandula angustifolia* incrementaron los niveles de carotenoides (Biesiada *et al.*, 2008).

Por otro lado, al evaluar la fertilización nitrogenada en *Labisia pumila*, Mohd *et al.* (2011) encontraron la mayor producción de fenoles totales en ausencia de nitrógeno. De manera similar, en flores de lavanda, Biesiada *et al.* (2008) reportaron una disminución en el contenido de polifenoles bajo el efecto de la alta fertilización nitrogenada. También en *Brassica juncea*, al incrementar la dosis de nitrógeno de 0 a 25 mM en la solución nutritiva, las concentraciones de fenólicos totales disminuyeron (Li *et al.*, 2008). Además, la aplicación de 120 a 160 kg ha⁻¹ de N ocasionó una disminución significativa en el contenido de flavonoides en flores de *Calendula officinalis* (Król, 2011). De hecho,

Felgines *et al.* (2000) considera que la deficiencia de nitrógeno aumenta el contenido de flavonoides en plantas.

Las plantas fertilizadas con altas concentraciones de nitrógeno tienden a incrementar su fotosíntesis, lo cual afecta tanto el metabolismo primario como el secundario (Mond *et al.*, 2011). Sin embargo, ningún estudio ha abordado la importancia del N en la biosíntesis de metabolitos secundarios en cempasúchil en condiciones de hidroponía, como se ha abordado en la presente investigación.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal

La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero. Plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca fueron trasplantadas en macetas de plástico negras de 1 L de capacidad, conteniendo como sustrato una mezcla de tezontle: perlita (60:40, v:v) (Figura 3.1)



Figura 3.1 Material vegetal, plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca y establecimiento del experimento en invernadero.

3.2.2. Manejo del experimento

Después del trasplante, las plántulas fueron regadas con agua durante cuatro días; posteriormente con una solución nutritiva de Steiner al 5 % (Steiner, 1984) complementada con micronutrientes a partir del producto comercial Tradecorp AZ™, en las concentraciones descritas por Trejo-Téllez *et al.* (2013). El pH de la solución nutritiva fue ajustado a 5.5 y ésta se suministró mediante un sistema de riego por goteo. Se realizaron cinco riegos por día en cada maceta, cada uno de ellas con un volumen de 50 mL. La solución nutritiva fue almacenada en un tambo de 200 L al cual se conectó a tubos de PVC hidráulico de 1 pulgada (2.54 cm). Cada gotero tuvo adaptadores de dos salidas, cada una con un tubín y estaca que fueron colocados en cada maceta. Los riegos fueron programados usando un temporizador y abastecidos con bombas de ½ HP. Se realizó una poda a los 30 días después del trasplante, desbotonando todas las plantas.

3.2.3. Tratamientos evaluados

Al inicio de la floración (30 ddt), se inició la aplicación de tratamientos, mismos que consistieron en diferentes niveles de nitrógeno: en la solución 4.2 mg L⁻¹ se adiciono como fuente de N nitrato de calcio, en la solución con dosis nitrogenada de 8.4 mg L⁻¹ se adicionaron como fuentes de N nitrato de calcio y nitrato de potasio y en la solución 12.6 mg L⁻¹ nitrato de amonio, nitrato de calcio y nitrato de magnesio. Cada uno de los tratamientos con 140 repeticiones.

3.2.4. Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con 140 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en una maceta con una planta.

3.2.5. Variables morfológicas

Fechas de muestreo. Se hicieron tres muestreos, a los 15, 30 y 45 días después de establecido los tratamientos. En cada muestreo se utilizaron ocho plantas por tratamiento y se midieron las siguientes variables:

3.2.5.1. Número de ramas primarias

Se cuantificó el número de ramas desde la base de la planta hasta la parte apical.

3.2.5.2. Longitud de ramas primarias

Se midió con un flexómetro (cm), desde la base del tallo principal hasta la parte apical de la rama.

3.2.5.3. Número de ramas secundarias

Se cuantificó el número de ramas desde la base de la planta hasta la parte apical.

3.2.5.4. Longitud de ramas secundarias

Se midió con un flexómetro (cm), desde la base del tallo de la rama primaria hasta la parte apical.

3.2.5.5. Número de botones cerrados

Se cuantificó el número de botones totales presentes en cada planta.

3.2.5.6. Número de cabezuelas abiertas

Se cuantificó el número de cabezuelas totales presentes en cada planta.

3.2.5.7. Diámetro de cabezuelas

Se midió con un vernier digital (cm), en las cabezuelas abiertas por planta.

3.2.5.8. Color

Se cosecharon hojas y flores por la mañana, 31 días después del inicio de la aplicación de los tratamientos (ddt), cortando cinco plantas por tratamiento. El color se registró con

apoyo de un colorímetro marca Hunter Lab modelo D25-PC2 (Reston, VA, EEUU). Para ello se tomaron los valores L, a y b en dos zonas opuestas de hojas y flores. Con estos valores se calculó el ángulo de tono (Hue) y la pureza del color (Croma) con las fórmulas: $Hue = \tan^{-1}(b/a)$; $Croma = (a^2 + b^2)^{1/2}$, de acuerdo a la metodología descrita por Little (1975), y la brillantez o luminosidad “L” obtenido directamente con el colorímetro, los cuales corresponden al espacio de color L*a*b según Minolta (2007).

3.2.6. Variables fisiológicas

3.2.6.1. Biomasa seca y concentración nutrimental

Después de 40 días de tratamiento, las plantas fueron cosechadas y seccionadas en flores, hojas, tallos y raíces. De las raíces se eliminó completamente el sustrato, enjuagando varias veces agua destilada. Una vez que las secciones estuvieron completamente limpias y libres de residuos de sustratos, éstas fueron introducidas en una estufa de aire forzado marca Felisa modelo FE291AD (Guadalajara, México) y secadas a 70 °C por 72 h para determinar la biomasa seca. Las muestras secas fueron molidas en un molino de acero inoxidable marca Wiley Modelo 4 con malla tamiz de 40. Las concentraciones de P, K, Ca, Mg y S fueron determinadas por digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico, de acuerdo a la metodología descrita por Alcántar y Sandoval (1999). La lectura de los extractos obtenidos después de la digestión y filtrado se determinó en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma acoplado ICP-OES Varian modelo 725-ES (Mulgrave, Australia). La concentración de N total se determinó empleando el método Semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965), utilizando ácido sulfúrico-salicílico para la digestión de las muestras.

3.2.6.2. Acumulación nutrimental

La acumulación de N, P, K, Ca, Mg y S en flores, hojas, tallos y raíces se obtuvo a partir de los datos de concentración nutrimental y peso de biomasa seca previamente determinados.

3.2.6.3. Carotenoides totales en flores

La cosecha de las inflorescencias fue manual cuando éstas alcanzaron su mayor apertura (38 ddt). Las inflorescencias cosechadas fueron secadas en estufa de aire forzado marca Felisa modelo FE291AD (Guadalajara, México) a 40 °C por 48 h; posteriormente se pesaron en una balanza analítica (marca Ohaus modelo Adventurer Pro, MA, EEUU), se molieron finamente y se almacenaron en recipientes de plástico con tapa a 4 °C, para su posterior análisis. La técnica de extracción de carotenoides totales, se realizó con el método descrito por Nagata y Yamashita (2002). De cada muestra se pesaron 150 mg de polvo fino de inflorescencias secas de cempasúchil, se agregaron 10 mL de acetona-hexano (4:6, v/v) y se agitó vigorosamente en vórtex durante un min; después el extracto se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4, y enseguida se leyó la absorbancias de los extractos de diez repeticiones en un espectrofotómetro (marca Thermo Scientific modelo Multiskan GO, Waltham, MA, EEUU) a 453, 503, 645 y 663 nm de longitud de onda. De acuerdo con la metodología descrita por Nagata y Yamashita (2002), para la estimación de carotenoides totales, los valores obtenidos se sustituyeron en la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides totales (mg/100 mL)} = (0.216)(A_{663}) - (1.220)(A_{645}) - (0.304)(A_{505}) + (0.452)(A_{453})$$

3.2.6.4. Fenoles totales

La extracción se realizó de acuerdo al método de Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994), utilizando la metodología empleada para material vegetal sólido. Para ello se pesaron 100 mg de hojas previamente maceradas y homogenizadas con nitrógeno líquido, y posteriormente se le agregaron 500 µL de metanol al 80 % (previamente enfriado a 4 °C). En seguida la mezcla se centrifugó durante 20 min a 4 °C y a 15000 rpm. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad se colocaron 50 µL del sobrenadante, se adicionaron 50 µL de agua desionizada, 100 µL de reactivo de Folin, se agitó en vórtex (se cronometró el tiempo a partir de agregado el reactivo de Folin). Después de 1 y antes de 8 min, se agregaron 200 µL de Na₂CO₃ al 20 %. Se dejó reposar 2 h en oscuridad y se leyó a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan). Como estándar se utilizó ácido gálico.

3.2.6.5. Flavonoides totales

Se realizó una complementación entre las metodologías empleadas por Ghasemi *et al.* (2009), Ebrahimzadeh *et al.* (2008) y Nanyonga *et al.* (2013). Para ello se pesaron 75 mg de hojas y flores frescas previamente maceradas con nitrógeno líquido, se agregaron 1.5 mL de metanol al 80 % y la mezcla se incubó durante una hora a 70 °C. Cuando el material se enfrió se procedió a centrifugar durante 20 min, a 4 °C y a 15000 rpm. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad se colocaron 200 µL del sobrenadante, se agregaron 600 µL de metanol al 80 %, 40 µL de cloruro de aluminio al 10 %, 40 µL de acetato de potasio 1 M y 1120 µL de agua destilada y se agitó al agregar cada solución. Se dejó reposar la solución durante 40 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se leyó en un espectrofotómetro (marca Thermo Fisher Scientific modelo Genesys 10 UV,

Madison, WI, EEUU) a 451 nm. Para el cálculo se utilizó la ecuación obtenida a partir de la elaboración de la curva estándar con quercetina.

3.2.6.6. Actividad antioxidante

Se realizó en base a complementación y modificación de metodologías utilizadas por algunos autores (Castañeda *et al.*, 2008; Chizzola *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2011; Kuskoski *et al.*, 2005; Scherer y Teixeira, 2009). Se procedió a pesar 100 mg de tejido vegetal previamente macerado y homogenizado con nitrógeno líquido, se agregaron 1.5 mL de etanol al 60 %, y se dejó reposar durante 24 h en refrigeración a 3 °C. Al siguiente día se centrifugó durante 20 min a 4 °C y a 15000 rpm; en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se colocaron 400 µL del sobrenadante, 600 µL de metanol al 80%, finalmente se agregó 1 mL de solución de DPPH y se agitó en vórtex. Transcurridos 15, 30 y 60 min de agregado el DPPH se leyó en un espectrofotómetro (ThermoFisher Scientific, Genesys 10 UV) a una longitud de onda de 517 nm. Se utilizó trólox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) como estándar. En la metodología se utilizaron 2 blancos, uno para calibrar el espectrofotómetro (400 µL de etanol al 60 % más 600 µL de metanol al 80 %) y el segundo blanco fue utilizado en la curva estándar como ausencia del antioxidante trólox.

3.2.6.7. Rendimiento de aceites esenciales

Se llevó a cabo por el método de hidrodestilación (HD), utilizando un sistema tipo Clevenger. El material vegetal (hojas y flores) se colocó en un matraz con fondo redondo por separado, se agregó agua destilada hasta cubrir el material vegetal por completo, se llevó a punto de ebullición durante 3 h contabilizadas a partir de la ebullición. Una vez transcurrido el tiempo, se recuperó la emulsión de agua con aceite y éste se extrajo con

diclorometano por tres veces (25 mL en cada lavado); posteriormente se concentró en un rotavapor marca Büchi modelo B-480 (Apeldoorn, Países Bajos) con vacío y a 30 °C, hasta evaporar la mayor cantidad de disolvente posible. El aceite que quedó depositado en el matraz se transfirió a un vial con una pipeta Pasteur y se dejó evaporar el resto del disolvente a temperatura ambiente en una campana de extracción. El rendimiento de aceite se calculó multiplicando el peso del aceite libre de solvente por 100 y dividiéndolo entre el peso del material vegetal seco inicial. Se hicieron tres repeticiones para esta variable.

3.2.6.8. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Esta evaluación se realizó 60 días después del inicio de tratamientos, empleando 26 plantas por tratamiento seleccionadas al azar. Las plantas fueron seccionadas en flores, hojas, tallos y raíces. Las muestras en fresco picadas en trozos pequeños, se colocaron en frascos de vidrio de 2 L con tapa, cada órgano se maceró con 600 mL de diclorometano. Los frascos fueron cubiertos con aluminio y se dejaron reposar por 72 h en oscuridad. Posteriormente los contenidos se filtraron y se colocaron en viales color ámbar, para finalmente procesar cada uno de los órganos de la planta por separado.

Para la identificación de compuestos se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP-6890 Series ®) acoplado a un detector de masas (marca HP-5973). Se utilizó una columna HP-5MS (Largo 30m, ID 0.250 mm, film 0.25 µm), velocidad promedio de 36 cm s⁻¹. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: temperatura inicial de 40 °C por 5 min, primera rampa hasta 150 °C, con un aumento de 9 °C min⁻¹. Se mantuvo por 3

min, segunda rampa hasta 220 °C con un aumento de 9 °C min⁻¹. La fuente de iones a 230 °C, cuadrupolo a 150 °C. Inyector modo splitless, temperatura de 220 °C, 6.97 psi. Como gas acarreador se usó helio y se inyectó 1 µL de las muestras concentradas en forma manual.

En la identificación de terpenoides se usó el programa Data Analysis y la base de datos que se consultó fue NIST (National Institute of Standards and Technology), basándose en tiempos de retención de cada compuesto y los espectros de masas.

3.2.6.9. Clorofilas a, b y totales

La concentración de clorofilas, se determinó 32 ddt. De los extractos obtenidos de aminoácidos, se tomó una alícuota 65 µL y se agregaron 170 µL de etanol al 98 % en un mismo tubo de reacción, se agitó en vórtex y se leyó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan), a longitudes de onda de 645 y 665 nm.

3.2.6.10. Azúcares totales en hojas y flores

Esta determinación se hizo en material vegetal tratado por 32 ddt. Se determinó por el método descrito por Southgate (1976). Para la solución madre se trituró 1 g de material vegetal, se agregaron 50 mL de etanol al 80 % y se colocó en ebullición por 20 min. Se tomó 1 mL de esta solución para ser evaporada en baño maría, posteriormente se diluyó en agua destilada (20 mL). En tubos de ensayo se colocó 1 mL de esta dilución, se adicionaron 2 mL de agua destilada y 6 mL de la solución de antrona. Posteriormente los tubos se colocaron en baño maría en ebullición por 3 min, se colocaron en agua fría y se leyó a 600 nm en espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan), usando una curva estándar de glucosa como referencia.

3.2.6.11. Aminoácidos libres totales en hojas y flores

La determinación de aminoácidos libres fue en hojas y flores frescas tratadas por 32 ddt, mediante una triple extracción etanólica, según lo descrito por Geiger *et al.* (1998). Se pesaron 20 mg de material vegetal, se colocaron en tubos de reacción para las extracciones etanólicas. Las extracciones etanólicas se realizaron incubando las muestras en baño María durante 20 min a 80 °C, agregando 500 µL de etanol 80 %, 300 µL de etanol al 80 % y 500 µL de etanol al 50%, respectivamente. La separación de fases se realizó por centrifugación (14000 rpm, 5 min, 4 °C). La concentración de aminoácidos libres se determinó empleando el método de ninhidrina (Moore y Stein, 1954). Las muestras fueron leídas en espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan) a una longitud de onda de 570 nm. Se utilizó leucina para la elaboración de la curva patrón.

3.2.6.12. Proteínas solubles totales en hojas y flores

Esta evaluación se realizó en tejidos tratados por 32 ddt. La extracción de proteínas se realizó a partir de hojas y flores de acuerdo a lo descrito por Höfner *et al.* (1989). La cuantificación se hizo en 0.5 g de material vegetal con solución de negro amino. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan) con una absorbancia de 640 nm. Se utilizó albúmina de suero bovino para la elaboración de la curva estándar.

3.2.7. Análisis de resultados

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente de acuerdo al diseño experimental empleado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) usando paquete estadístico SAS (SAS, 2011). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Variables morfológicas

En el primer muestreo, después de 15 días de tratamiento, no hubo diferencias estadísticas en el número de ramas primarias y número de botones cerrados. En la variable longitud de ramas primarias, solo fueron estadísticamente los tratamientos con dosis de N de 4.2 y 12.6 mg L⁻¹ de solución nutritiva; éste último, superior al primero en 23.29 %. Las plantas testigo no fueron diferentes a las que se les aplicaron diferentes niveles de N (**Cuadro 3.1**).

Cuadro 3.1 Parámetros morfológicos en plantas de cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la fase de floración.

Nitrógeno en la solución (mg L ⁻¹)	Número de ramas primarias	Longitud de ramas primarias, cm	Número de botones cerrados
0	3.00± 0.46 a	8.63±0.33 ab	3.25±0.52 a
4.2	2.75±0.23 a	7.47±0.33 b	2.75±0.23 a
8.4	3.63±0.37 a	8.20±0.73 ab	3.50±0.27 a
12.6	3.38±0.46 a	9.21±0.52 a	2.88±0.68 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En la evaluación realizada 30 días después del inicio de tratamientos, el número de ramas primarias y secundarias, así como el número de botones cerrados no fueron diferentes estadísticamente entre tratamientos. En el caso de la variable longitud de ramas primarias, plantas tratadas con la dosis más baja de N (4.2 mg L⁻¹) tuvieron valores significativamente menores a los de plantas testigo y con la dosis media de éste (8.4 mg L⁻¹) durante la fase de floración (**Cuadro 3.2**).

El número de cabezuelas abiertas se relacionó de manera positiva con la dosis de N empleada, presentando las medias más altas con las dosis de N de 8.4 y 12.6 mg L⁻¹. Con la ausencia de N y la dosis menor de éste se redujo significativamente el número de

cabezuelas abiertas. El mayor diámetro de éstas se registró con la dosis más alta de N adicionada a la solución nutritiva y superó en 15.99 y 12.13 % a los tratamientos testigo y con la menor dosis de N; éstos no fueron estadísticamente diferentes (**Cuadro 3.2**). Diversas investigaciones reportan una relación directa entre la dosis de N y los parámetros de crecimiento, tal es el caso de lechuga, donde al tratarla con cuatro dosis de N (0, 60, 120 y 180 kg ha⁻¹), se concluyó que con la más alta dosis nitrogenada se tuvo mayor altura de planta (Boroujerdnia y Alemzadeh, 2007). En orégano, con cuatro niveles de N evaluados (0, 1, 2, 4 y 8 g por maceta), encontraron una relación positiva entre la dosis y la altura de planta (Omer, 2008). En esta investigación no es contundente el efecto del N en los parámetros del crecimiento en los muestreos realizados a los 15 y 30 días después del inicio de tratamientos, con alta probabilidad esto es debido a la fase fenológica en la cual se aplicaron los tratamientos (floración), donde ya estaba establecida la etapa vegetativa y las plantas se habían nutrido con la misma dosis de nitrógeno en la solución nutritiva.

Cuadro 3.2 Parámetros morfológicos en plantas de cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la fase de floración.

Nitrógeno en la solución (mg L ⁻¹)	Número de ramas primarias	Longitud de ramas primarias, cm	Número de ramas secundarias	Número de botones cerrados	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuela, cm
0	4.50±0.38 a	7.26±3.63 a	1.03±0.52 a	3.63±0.53 a	1.75±0.23 bc	4.94±0.25ab
4.2	4.00±0.27 a	7.36±3.68 b	0.88±0.32 a	3.13±0.32 a	1.25±0.23 c	5.11±0.13 ab
8.4	5.00±0.65 a	8.91±4.46 a	1.75±0.69 a	3.63±1.10 a	2.50±0.27 a	4.73±0.39 b
12.6	5.25±0.64 a	8.23±4.12 ab	1.25±0.44 a	3.75±1.09 a	2.38±0.26 ab	5.73±0.36 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En el último muestreo realizado después de 45 días del inicio de tratamientos, el efecto de la nutrición nitrogenada proporcionada durante la fase vegetativa se ve reducido. Se observan diferencias estadísticas significativas en el número de ramas primarias, el número de cabezuelas abiertas y el diámetro de éstas. Las plantas tratadas con dosis de N de 8.4 y 12.6 mg L⁻¹ tuvieron en promedio 1.5 y 2.75 más ramas primarias que el

tratamiento testigo, respectivamente. Mientras que el diámetro de cabezuelas de plantas del tratamiento testigo, representó el 83.88 % del diámetro de cabezuelas registrado en plantas tratadas con la dosis más alta de N (12.6 mg L^{-1}) (**Cuadro 3.3**).

Król (2011), en *Calendula officinalis* L., se determinó el efecto de diferentes dosis de N (0, 40, 80, 120 y 160 kg ha^{-1}) en algunas características morfológicas de cabezuelas, rendimiento y calidad, concluyendo que en esta especie al aplicar la dosis más alta de N existía una influencia significativa en el número de flores pero no hubo diferencia significativa en el diámetro. En esta investigación, se observó en este muestreo el efecto positivo de dosis crecientes de N en el número y en el diámetro de las cabezuelas.

Cuadro 3.3 Parámetros morfológicos en plantas de cempasúchil después de 45 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la fase de floración.

Nitrógeno en la solución (mg L⁻¹)	Número de ramas primarias	Longitud de ramas primarias, cm	Número de ramas secundarias	Longitud de ramas secundarias, cm	Número de botones cerrados	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuela, cm
0	4.63±0.53 b	8.40±0.40 a	2.75±0.99 a	3.20±1.27 a	5.25±1.46 a	1.75±0.23 b	5.36±0.26 b
4.2	4.63±0.46 b	8.34±0.45 a	2.38±0.84 a	3.45±0.86 a	5.13±1.32 a	1.75±0.44 b	5.49±0.36 ab
8.4	6.13±0.68 ab	8.60±0.49 a	4.88±0.98 a	2.95±0.92 a	5.88±1.47 a	2.75±0.35 a	5.46±0.38 ab
12.6	7.38±0.65 a	8.01±0.38 a	3.25±1.09 a	4.11±1.14 a	7.75±1.51 a	2.63±0.26 ab	6.39±0.37 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

3.3.2. Color (Luminosidad, Hue y Cromo)

Romojaro *et al.* (2007), reportan que el contenido de nitrógeno en plantas está directamente relacionado con la síntesis de proteínas y carotenoides, pudiendo afectar a la coloración de los diferentes órganos de la planta.

En hojas, el incremento en la dosis de N se asoció con reducción en los valores de luminosidad (value) y croma (tonalidad o saturación). También hubo una reducción significativa de luminosidad en hojas con la dosis más alta de N (12.6 mg L^{-1}) indica que el color fue más oscuro o bien menos brillante. Por otra parte, los altos valores de croma en el tratamiento testigo, indican colores pálidos; mientras que en los tratamientos con N los colores fueron más opacos. En los parámetros de hue (matiz, color propiamente), no existieron diferencias estadísticas entre tratamientos (**Cuadro 3.4**). De manera coincidente a los hallazgos aquí reportados, al evaluar la fertilización nitrogenada (0, 75, 150, 225 y 300 kg ha^{-1}), en el color de los dientes de cinco cultivares de ajo colorado (*Allium sativum* L.); se observaron reducciones en los valores de croma a medida que se incrementó la dosis de N. Así también, el hue (matiz) en tres de las cinco variedades (Fuego, Gostoso y Rubí) se redujo significativamente con el incremento en la dosis nitrogenada (Gaviola y Lipinski, 2008). En calabacita, Sedano-Castro *et al.* (2011), al evaluar tres niveles de N ($150, 240$ y 330 kg ha^{-1}), encontraron que el color verde en frutos fue favorecido con las dosis más alta de N (330 kg ha^{-1}).

Cuadro 3.4 Parámetros de color en hojas de plantas de cempasúchil tratadas durante 30 días en la fase de plena floración, con distintas dosis de N en la solución nutritiva.

Nitrógeno en la solución (mg L ⁻¹)	Color		
	Luminosidad	Hue	Croma
0	34.18±0.72a	54.05±1.09 a	8.99±0.56 a
4.2	33.02±2.43 ab	54.46±1.16 a	8.06±1.77 ab
8.4	29.92±0.66 ab	51.40±1.34 a	4.78±1.06 b
12.6	28.34±0.52 b	51.84±0.86 a	4.14±0.44 b

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Los colores intensos de las flores de cempasúchil están relacionados con el contenido de carotenoides, es por ello que su diversidad de tonos potencializa el aprovechamiento del colorante. El género *Tagetes* varía en los tonos naranjas, amarillos y rojos (Serrato, 2004). En flores, solo la luminosidad fue influenciada significativamente por los tratamientos. La dosis de N de 8.4 g L⁻¹ fue la que ocasionó cabezuelas más brillantes, (**Cuadro 3.5**). De acuerdo con Quintanilla (2004), evaluaron la caracterización colorimétrica y morfométrica de capítulos florales de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula*, de acuerdo a su clasificación establecieron subgrupos el (F5B y F6A) corresponden a los más amarillos, y (F5C, F5D y F5E) con capítulos amarillo naranja, los valores de luminosidad en nuestro estudio son más cercanos a los que corresponden a la clasificación F5E.

Cuadro 3.5 Parámetros de color en flores de plantas de cempasúchil tratadas durante 30 días en la fase de plena floración, con distintas dosis de N en la solución nutritiva.

Nitrógeno en la solución (mg L ⁻¹)	Color		
	Luminosidad	Hue	Croma
0	60.93±1.21b	66.02±1.03 a	46.26±0.74 a
4.2	60.68±0.70 b	61.03±4.01 a	47.06±0.19 a
8.4	64.64±0.93 a	67.85±1.31 a	47.92±0.97 a
12.6	62.14±1.17 ab	66.36±0.72 a	47.23±0.68 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

3.3.3. Variables fisiológicas

3.3.3.1. Biomasa seca

La acumulación de biomasa seca tuvo el siguiente orden: flores>hojas>tallos>raíces independientemente del nivel de N evaluado (**Figura 3.2**).

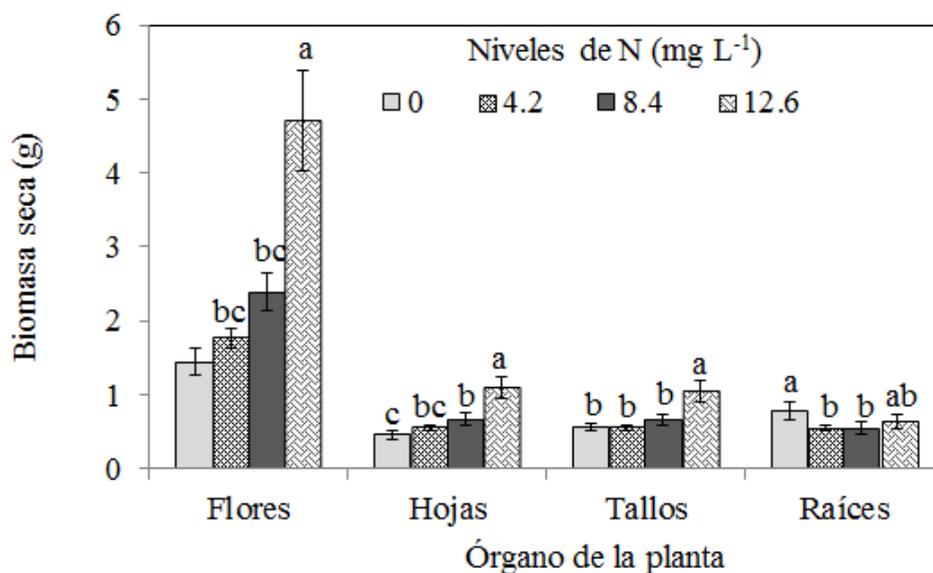


Figura 3.2 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con cuatro niveles de N en la solución nutritiva. Medias ± desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En seco, el peso de flores, hojas y tallos fue estadísticamente superior en el tratamiento con mayor concentración de N (12.6 mg L^{-1}); donde el peso de las flores es superior en casi tres veces al peso del resto de los órganos (**Figura 3.2**). En otros estudios se reportan tendencias similares a las obtenidas en esta investigación. Anuradha *et al.* (1990), encontraron que el peso individual de flor aumentó al incrementar las dosis de N en *Calendula officinalis* L. En esta misma especie, Rahmani *et al.* (2011), reportaron el mayor rendimiento con la dosis más alta de N evaluada ($90 \text{ kg de N ha}^{-1}$), concluyendo que esta dosis aumentó la capacidad de producción de asimilados en los órganos reproductores y en consecuencia se incrementó la producción de flores. Por el contrario, Qasim *et al.* (2003) evaluaron los efectos de diferentes dosis de nitrógeno (0, 20, 30, 40 y 50 g de N por planta), en el desarrollo y florecimiento de *Jasminum sambac*, encontrando que el número y peso fresco de flores fueron máximos con la dosis de 20 g de N por planta.

La biomasa seca de hojas mostró la misma tendencia observada en flores, mayor peso con el nivel alto de N adicionado a la solución nutritiva, siendo diferente estadísticamente al resto de los tratamientos (**Figura 3.2**). De la misma manera, en lechuga, al evaluar cuatro concentraciones de nitrógeno (0, 60, 120 y 180 kg de N ha^{-1}), la biomasa seca de hoja incrementó con el aumento en la dosis de N (Boroujerdnia y Alemzadeh, 2007).

En el peso seco de tallos, se registró la misma tendencia que en flores y hojas (**Figura 3.2**). En raíces, se tuvo el mayor peso de biomasa seca en los tratamientos consistentes en ausencia de N y el de 12.6 mg L^{-1} (**Figura 3.2**).

3.3.3.2. Concentración y acumulación de macronutrientos (N, P, K, Ca, Mg y S)

Nitrógeno. El orden de concentración de N fue diferente entre tratamientos. En plantas tratadas con dosis de N de 12.6 mg L⁻¹, la mayor concentración de este elemento se registró en hojas y tallos; en plantas tratadas con 8.4 mg L⁻¹, se registró en flores la mayor concentración de N; y en el tratamiento sin nitrógeno la mayor concentración de éste se tuvo en raíces (**Figura 3.3**).

En todos los órganos existieron diferencias estadísticas significativas en la concentración de N. En hojas y tallos (**Figuras 3.3A y 3.3C**), se observa una relación positiva entre la dosis de N suministrada y la concentración de este elemento. En hojas las concentraciones registradas con las dosis de N de 8.4 y 12.6 mg L⁻¹, fueron mayores a 30 g kg⁻¹ de materia seca y estadísticamente superiores al resto de los tratamientos (**Figura 3.3A**). En tallos, los resultados de la prueba de comparación de medias, forman cuatro grupos estadísticos, donde se observa la media más alta de concentración con la dosis de N de 8.4 mg L⁻¹. Es importante enfatizar, que con la dosis siguiente, la concentración de N en tallo se reduce de manera significativa (**Figura 3.3B**). En raíces, de manera general la tendencia observada en función de la concentración de N adicionada a la solución nutritiva es negativa (**Figura 3.3D**).

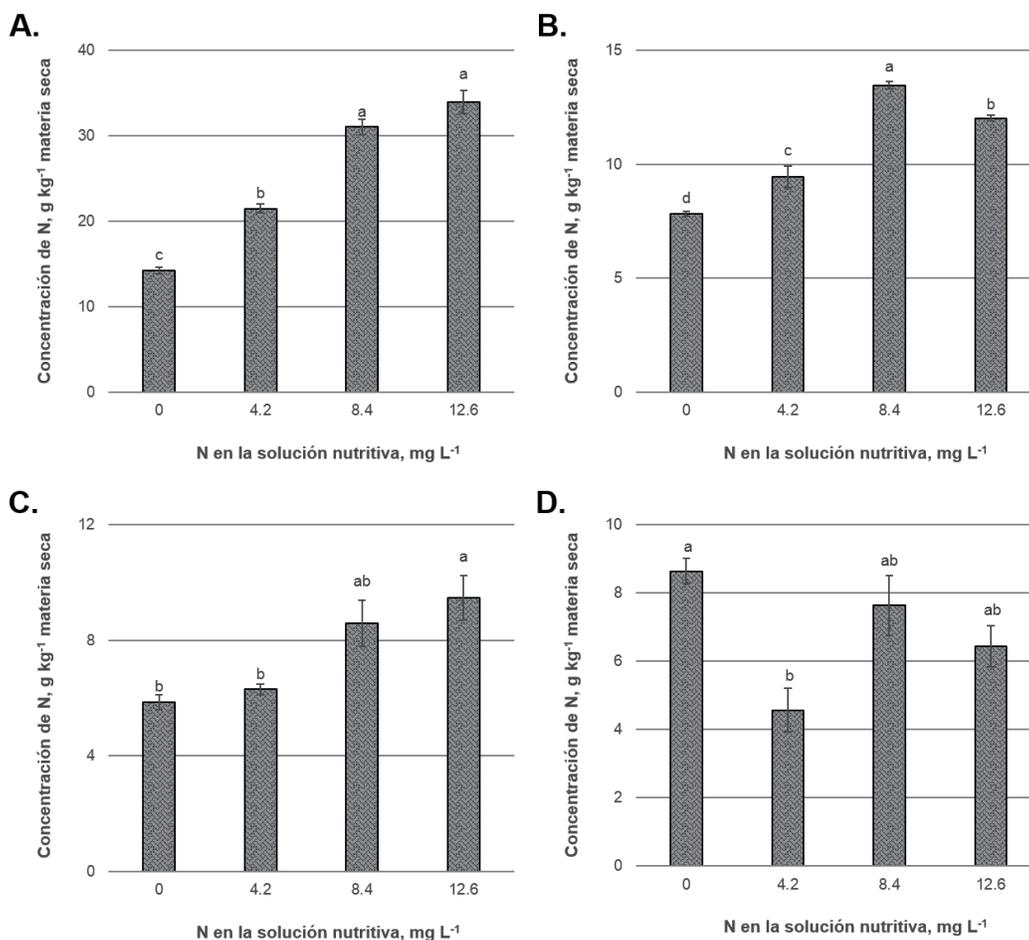


Figura 3.3 Concentración de nitrógeno en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de planta de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

El orden de acumulación de N en la dosis más alta de N fue el siguiente flores > hojas > tallos > raíces. La acumulación de N en todos los órganos evaluados mostró diferencias estadísticas significativas, y la tendencia fue similar a la observada en la variable concentración de N; es decir, se observó que la mayor concentración de N en la solución nutritiva, incrementó significativamente la acumulación de N en hojas, flores y tallos, excepto en raíces donde la mayor acumulación de N fue en el testigo (**Figura 3.4**).

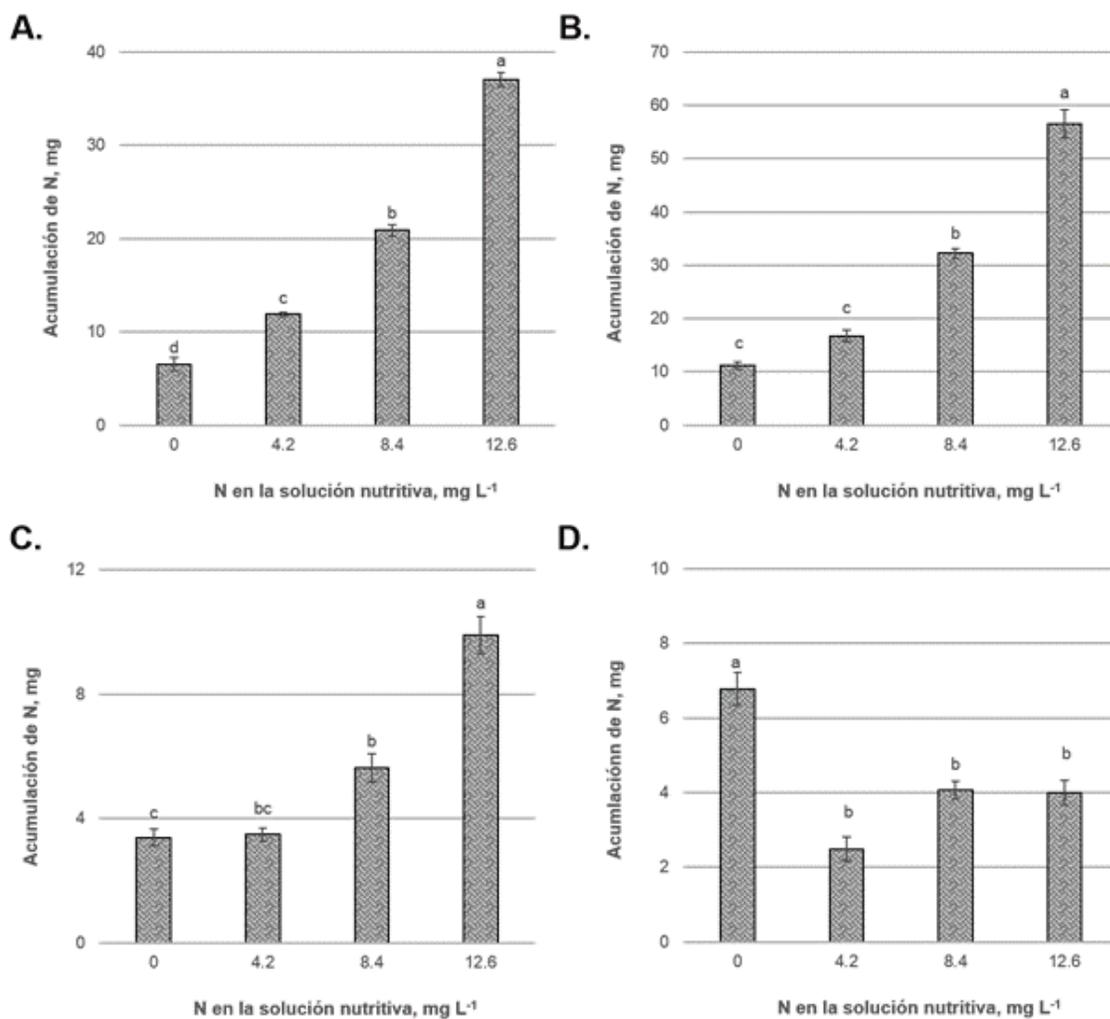


Figura 3.4 Acumulación de nitrógeno en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de cempasúchil tratado con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Fósforo. El orden de concentración de P, independientemente del nivel de N adicionado fue como sigue: hojas > tallos > flores > raíces (**Figura 3.5**). La concentración foliar de P fue estadísticamente superior con las dos dosis más altas de N, en comparación con el resto de los tratamientos (**Figura 3.5A**). En flores, la concentración de P solo fue estadísticamente diferente entre el tratamiento testigo y el tratamiento con la dosis más

alta de N adicionada a la solución nutritiva; se observó una relación negativa; es decir la dosis creciente de N reduce de manera gradual la concentración de P en flores (**Figura 3.5B**). Tallos de plantas tratadas con N a una concentración de 8.4 mg L⁻¹ tuvieron una concentración de P estadísticamente superior al resto de los tratamientos (**Figura 3.5C**). En raíces no existieron diferencias estadísticas entre tratamientos en la concentración de P (**Figura 3.5D**).

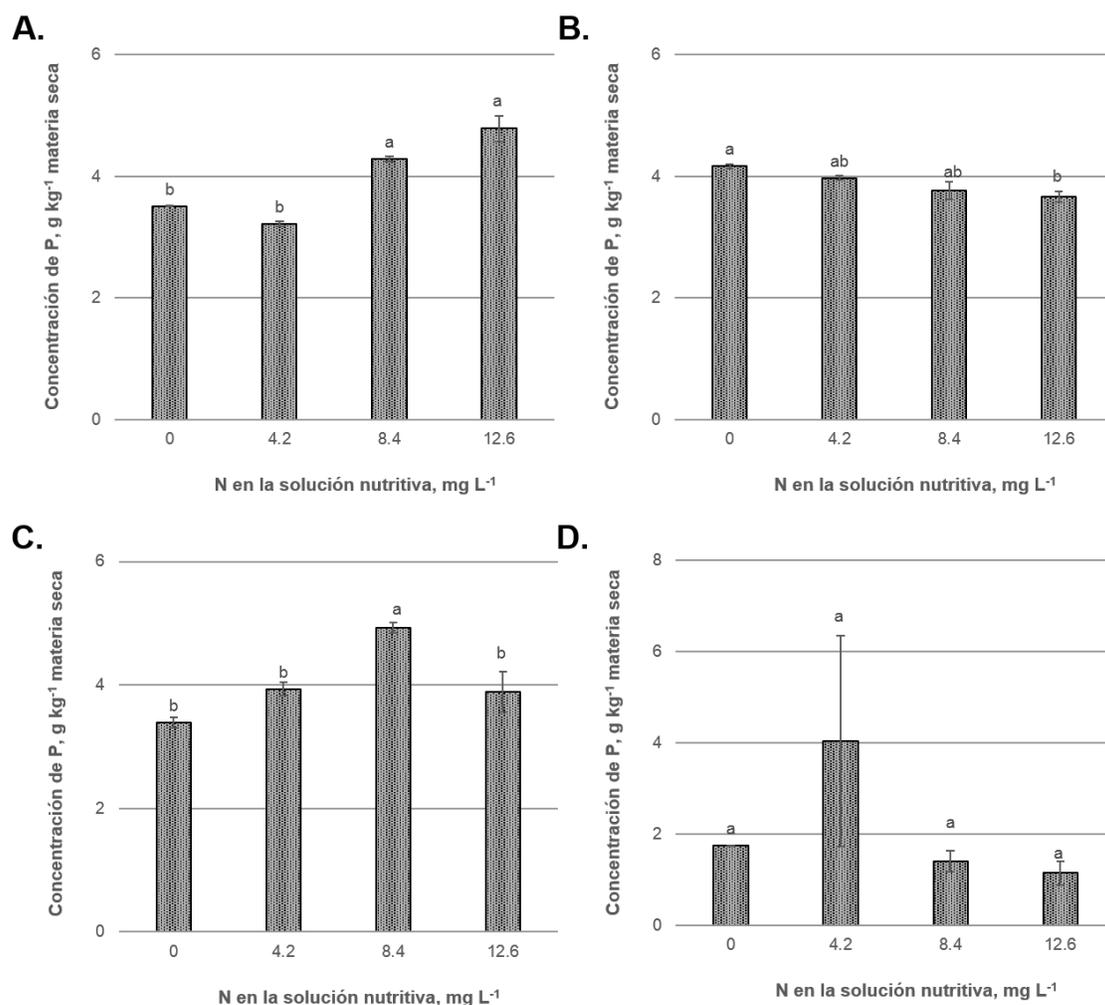


Figura 3.5 Concentración de fósforo en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Con las dos concentraciones de N más altas en la solución nutritiva, se registró el siguiente orden de acumulación de P flores > hojas > tallos (**Figura 3.6**). Así también se observa en hojas, flores y tallos, una relación positiva entre la concentración de P en estos órganos y la concentración de N en la solución nutritiva (**Figuras 3.6A, 3.6B y 3.6C**). En raíces no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, en la variable acumulación de P (**Figura 3.6**).

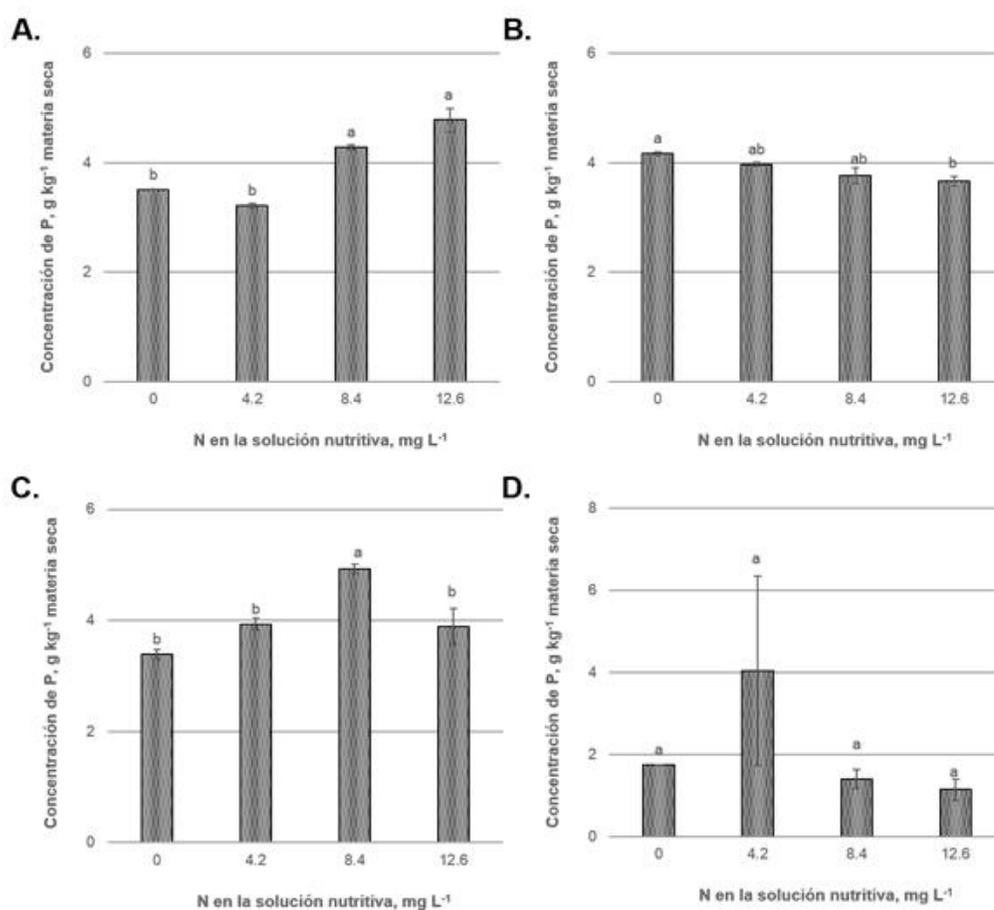


Figura 3.6 Acumulación de fósforo en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Potasio. La concentración de K en hojas y tallos guardaron una relación positiva con la concentración de N en la solución nutritiva en el intervalo de 0 a 8.4 mg L⁻¹; con la concentración superior de N en la solución nutritiva, la concentración de K en ambos órganos disminuye en forma importante (**Figuras 3.7A y 3.7C**). La misma tendencia observada en hojas y tallos, se tuvo en inflorescencias, donde en el intervalo de N de 0 a 8.4 mg L⁻¹ se observaron incrementos moderados, no significativos en la concentración de K en este órgano. Así también, alta dosis de N redujo la concentración de K en flores (**Figura 3.7B**). En raíces, se observan las mismas tendencias que en el resto de los órganos, pero no existieron diferencias estadísticas entre tratamientos (**Figura 3.7D**).

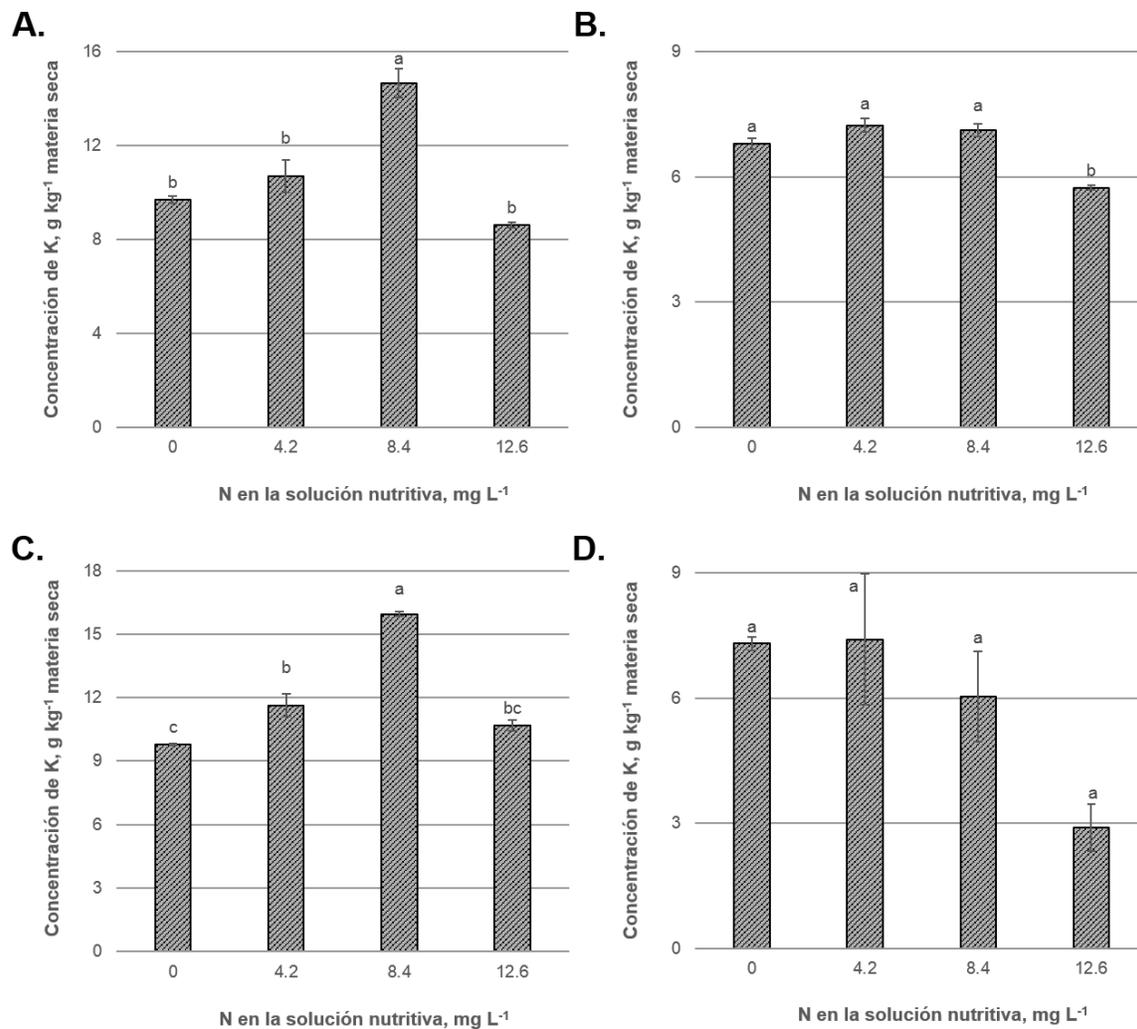


Figura 3.7 Concentración de potasio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En la acumulación de K, existieron diferencias estadísticas significativas en todos los órganos de la planta, en función de los tratamientos de N evaluados (**Figura 3.8**). La mayor acumulación de K⁺ se registró en flores > tallos > hojas > raíces. En hojas, flores y tallos se observó una relación positiva la acumulación de K y la concentración de N en la

solución nutritiva; es decir, con la mayor concentración de N en la solución nutritiva se registró la mayor acumulación de K⁺ (**Figuras 3.8A, 3.8B y 3.8C**). En raíces, altas dosis de N en la solución nutritiva reducen significativamente la acumulación de K (Figura 3.8D).

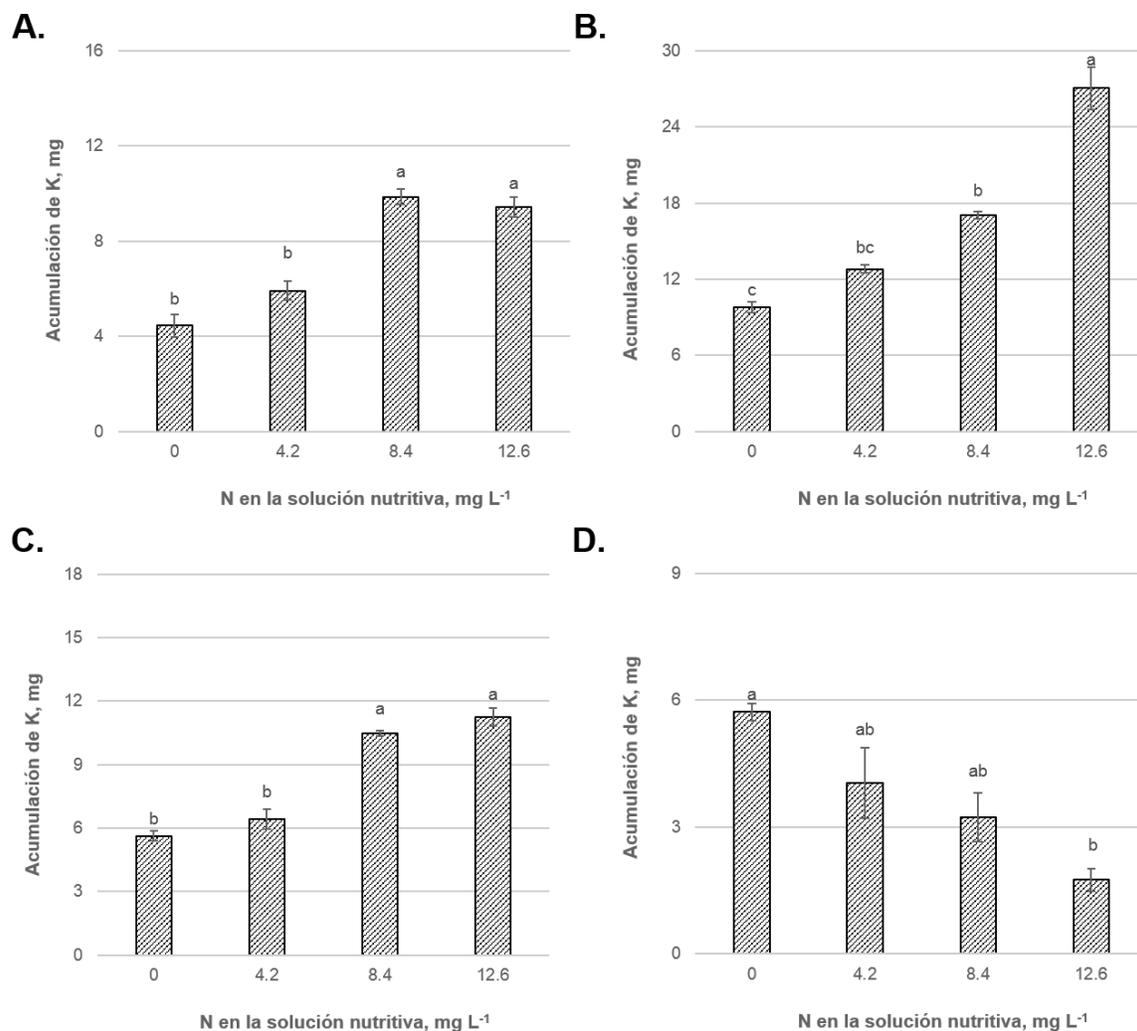


Figura 3.8 Acumulación de potasio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Calcio. En hojas y raíces, la concentración de Ca no fue influenciada de manera significativa por las concentraciones de N en la solución nutritiva (**Figuras 3.9A y 3.9D**). En flores, la concentración de Ca se reduce de forma significativa con concentraciones de N en la solución nutritiva superiores o iguales a 8.4 mg L⁻¹ (**Figura 3.9B**). En tallos se tuvieron diferencias estadísticas significativas en la concentración de Ca entre tratamientos, observándose que con dosis de N de 8.4 mg L⁻¹ de solución nutritiva, ésta es mayor al resto (**Figura 3.9C**).

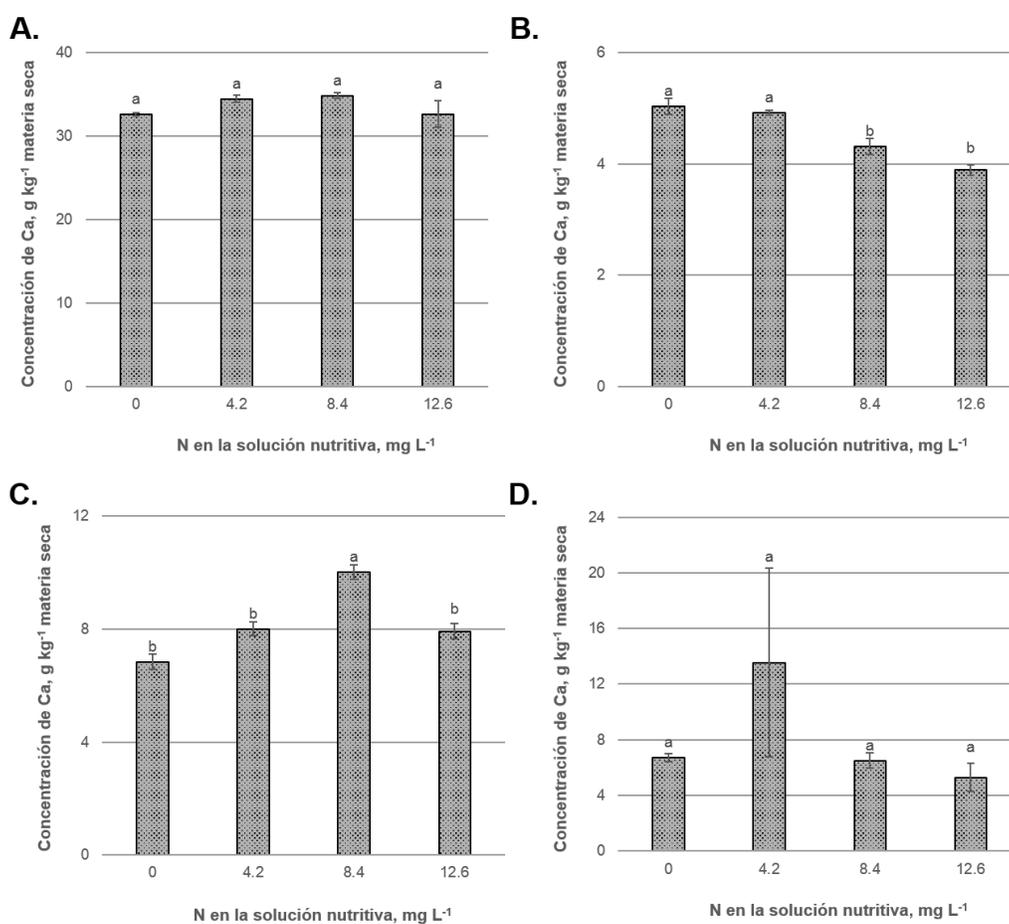


Figura 3.9 Concentración de calcio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

La acumulación de Ca en hojas, flores y tallos (**Figuras 3.10A, 3.10B y 3.10C**) fue significativamente mayor al resto de los tratamientos, cuando en la solución nutritiva la concentración de N fue de 12.6 mg L⁻¹. En raíces los tratamientos con las dosis de N en la solución nutritiva no afectaron estadísticamente la acumulación de Ca (**Figura 3.10D**).

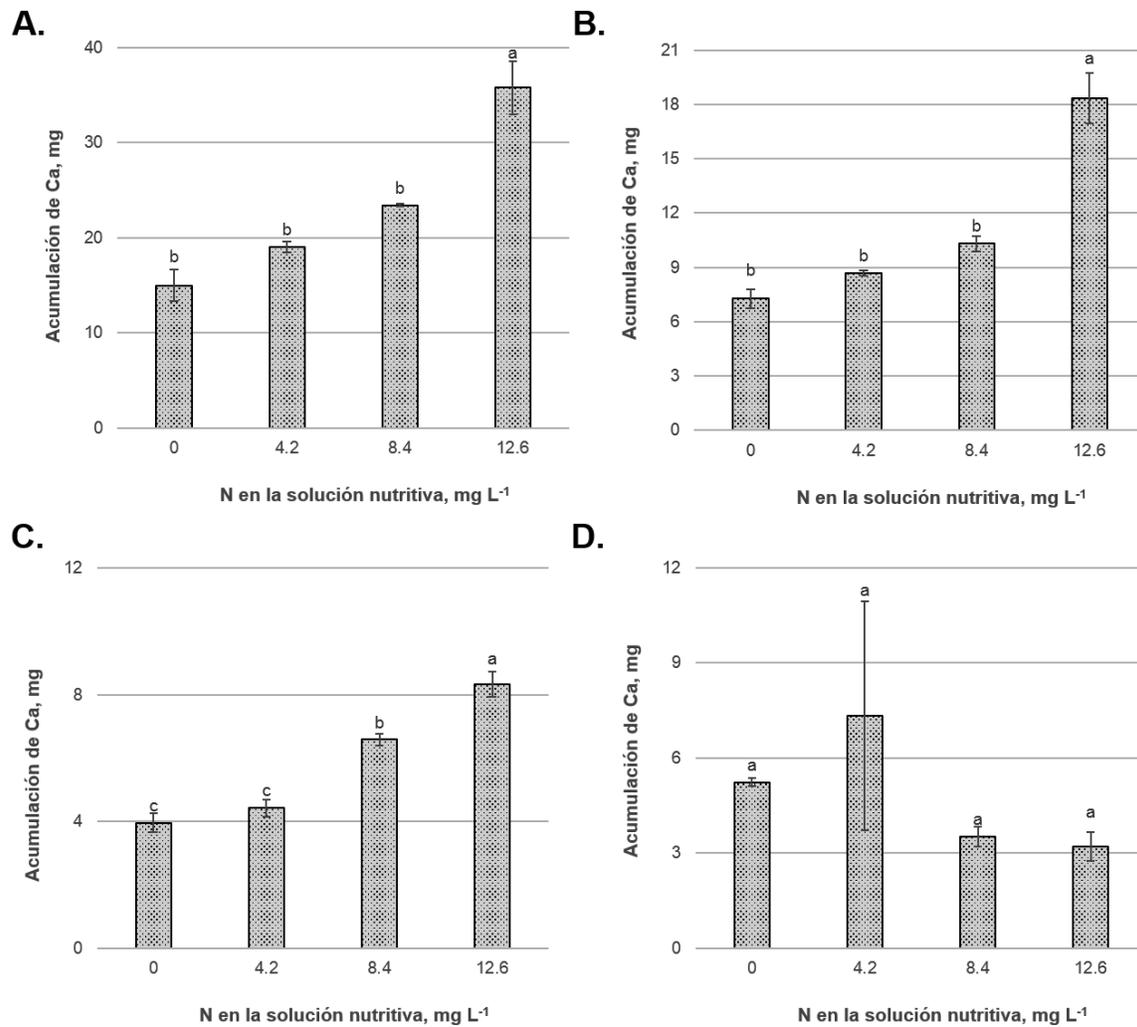


Figura 3.10 Acumulación de calcio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias ± DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Magnesio. Se observó una relación positiva entre la dosis de N en la solución nutritiva en el intervalo de 0 a 8.4 mg L⁻¹ y la concentración de Mg en hojas y tallos (**Figuras 3.11A y 3.11C**). Por el contrario, en flores el incremento en la dosis de N reduce la concentración de Mg (**Figura 3.11B**). Al igual que otros macronutrientes, la concentración de Mg en raíces no fue afectada por los tratamientos (**Figura 3.11D**).

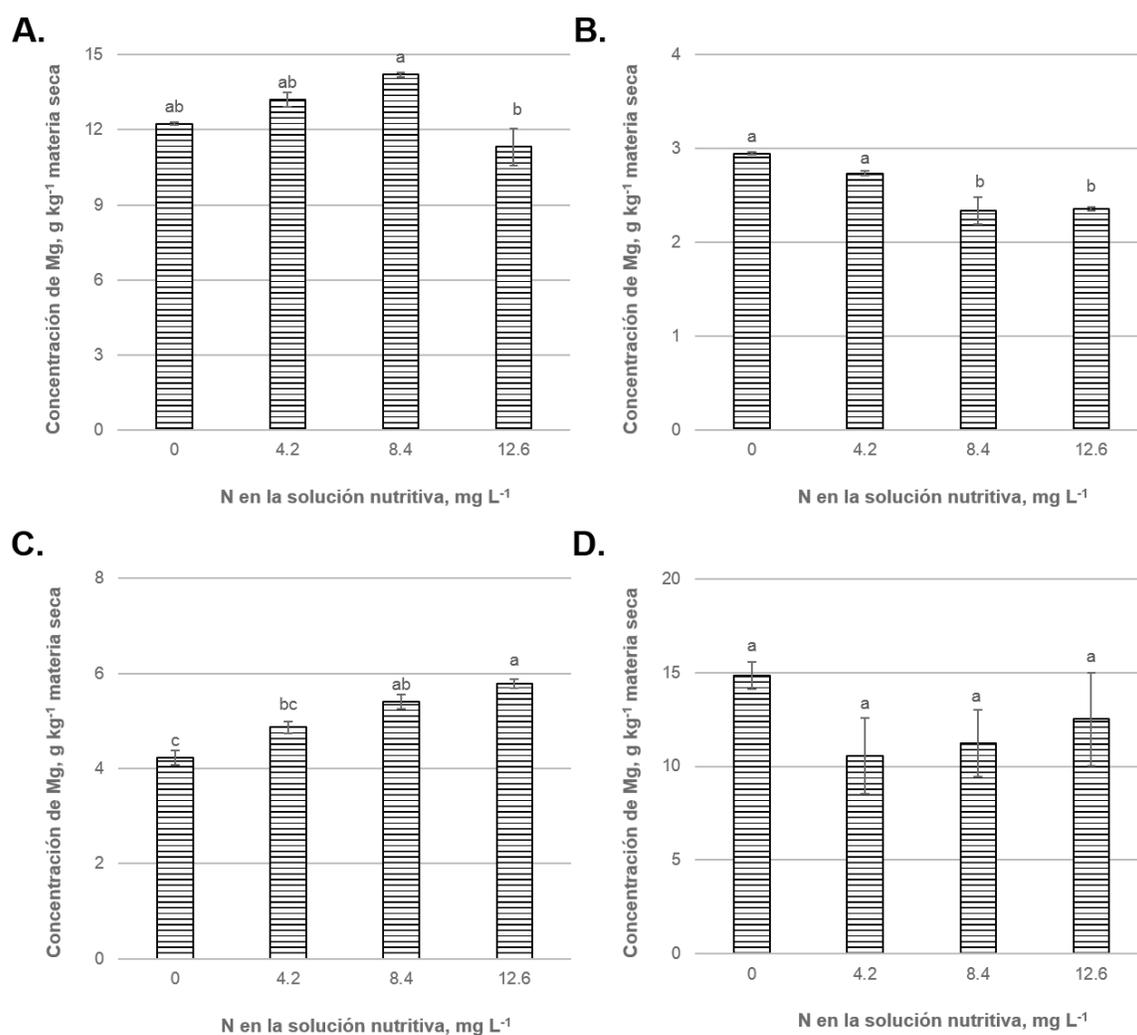


Figura 3.11 Concentración de magnesio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En la acumulación de Mg, existieron diferencias estadísticas significativas en todos los órganos de la planta de cempasúchil (**Figura 3.12**). Se observó una relación directa entre ésta y la concentración de N en la solución nutritiva; es decir, con la mayor concentración de N en la solución nutritiva se registró la mayor acumulación de Mg; lo anterior en hojas, flores y tallos (**Figuras 3.12A, 3.12B y 3.12C**). En raíces, por el contrario existió una relación inversa entre la acumulación de Mg y la dosis de N en la solución nutritiva (**Figura 3.12D**).

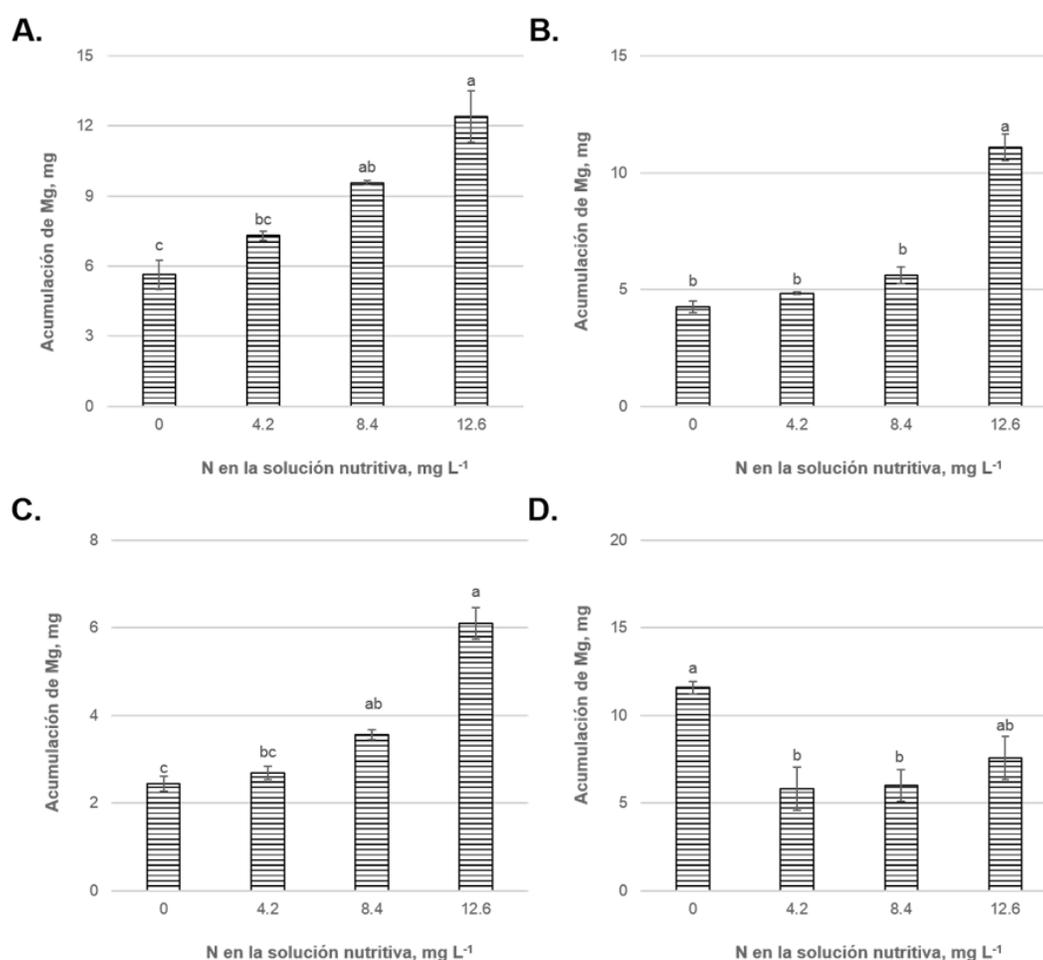


Figura 3.12 Acumulación de magnesio en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Azufre. La mayor concentración de S se registró en hojas > tallos > flores (**Figura 3.13**). En los tratamientos consistentes en 4.2 y 8.4 mg N L⁻¹ de solución nutritiva, se registraron las mayores concentraciones de S en hojas (**Figuras 3.13A**); en tallos, con la dosis de N de 8.4 mg L⁻¹ (**Figura 3.13C**). En flores, la ausencia de N y la menor dosis de éste en la solución nutritiva, propiciaron el incremento en la concentración de azufre (**Figura 3.13B**). En raíces no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en la concentración de S (**Figura 3.13D**).

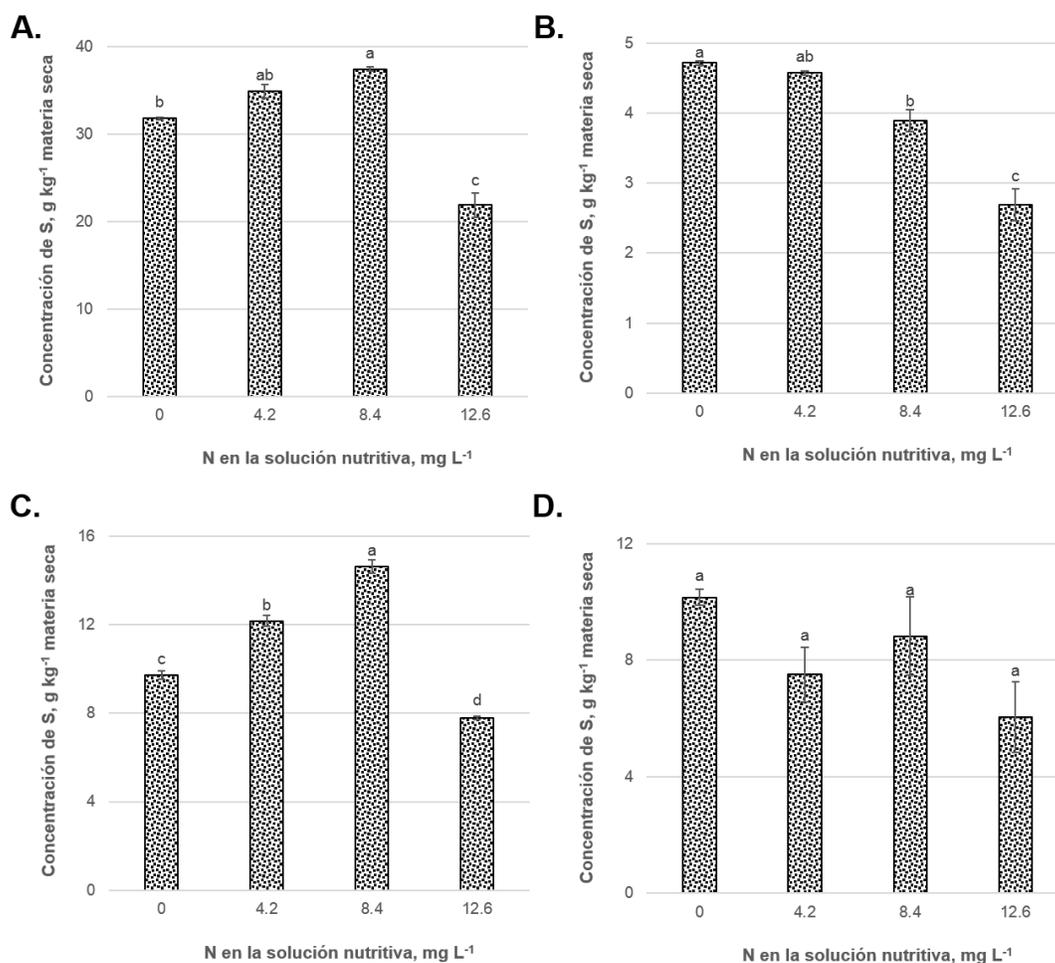


Figura 3.13 Concentración de azufre en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias ± DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

El orden de acumulación de S en órganos de cempasúchil fue hojas > flores > raíces > tallos; y entre órganos existieron diferencias estadísticas entre tratamientos (**Figura 3.14**). En el intervalo de concentración de N de 0 a 8.4 mg L⁻¹, se observan tendencias positivas en la acumulación de S en hojas, tallos y flores; destacando que con la dosis superior de N los resultados obtenidos en esta variable no son diferentes estadísticamente a los registrados con la dosis de N de 8.4 mg L⁻¹ en la solución nutritiva (**Figura 3.14A, 3.14B Y 3.14C**).

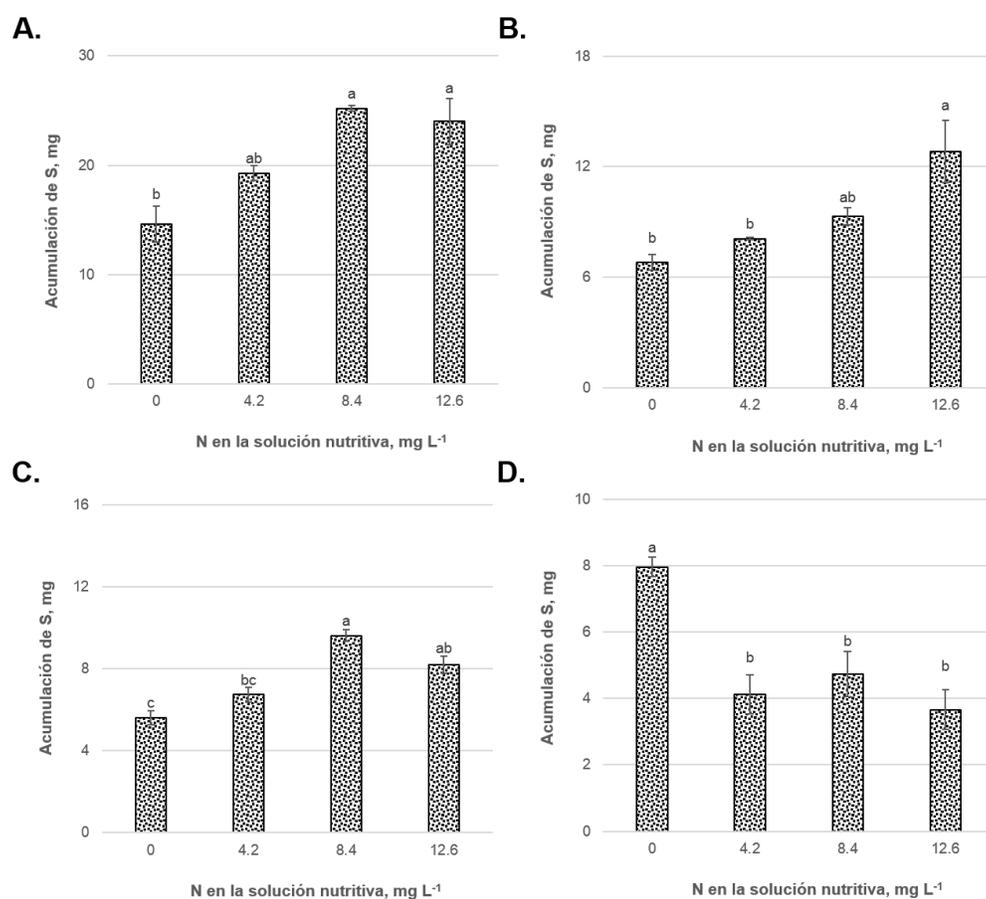


Figura 3.14 Acumulación de azufre en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes dosis de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias ± DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Las fuentes de nitrógeno absorbidas por las plantas incluye formas inorgánicas (nitrato y amonio) y orgánicas (urea y aminoácidos). Las plantas han involucrado múltiples estrategias para adquirir nitrógeno (Crawford y Glass, 1998). Las especies vegetales tienen la capacidad de absorber y asimilar nitrato, amonio, urea y aminoácidos como fuentes de nitrógeno, pero la respuesta a una particular forma de nitrógeno varía según la especie.

El nitrógeno (N) es fundamental en el metabolismo, crecimiento y desarrollo de las plantas y las interacciones con otros nutrimentos. Las plantas absorben el P en forma de fosfato inorgánico, como aniones fosfato monobásico (H_2PO_4^-) y fosfato dibásico (HPO_4^{2-}). La capacidad de las raíces de absorber P está regulada por transportadores de alta y baja afinidad (Rubio, 2002). Numerosos trabajos reportan interacciones positivas entre el N y P, debido a que el N induce el incremento en la absorción de P y altos rendimientos (Adams, 1980). En un estudio realizado por Wilkison *et al.* (1999), mencionan que el N incrementa la absorción de P. Mientras tanto, las concentraciones crecientes de K, N y Ca provocan la deficiencia de Mg en tomate, causando reducciones en el rendimiento, las mayores pérdidas de rendimiento ocurren con altos niveles de N y K (Adatia y Winsor, 1971). La absorción de NO_3^- estimula la absorción de cationes como el K y el Ca (Fageira, 2001), como lo menciona Kawasaki (1995) donde el contenido de Ca aumenta cuando se aplicó N como fuente de nitrógeno NO_3^- , en arroz, trigo, maíz, calabaza y jitomate. La interacción negativa de N-Mg ha sido reportada en Chile por García-Hernández *et al.* (2007) y en nopal por Magallanes-Quintanar *et al.* (2005), aunque aún no tiene una explicación fisiológica.

3.3.3.3. Carotenoides totales en flores

Para optimizar la producción de carotenoides, no basta producir biomasa, sino se requiere determinar las condiciones ambientales que estimulen su biosíntesis dentro de las células (López-Elías *et al.*, 2013). En este estudio las mayores concentraciones de carotenoides totales en flores se registraron en plantas tratadas con concentraciones de N de 4.2 y 8.4 mg L⁻¹ en la solución nutritiva (**Figura 3.15**). De manera similar a estos hallazgos, en el cultivo con tomillo al evaluar cuatro dosis de N (0, 45, 90 y 135 kg ha⁻¹), obtuvieron un efecto negativo con las dosis más altas de N (> 90 kg ha⁻¹) en la concentración de carotenos durante la segunda cosecha de evaluación (Baranauskiene *et al.*, 2003). De igual manera, Ukom *et al.* (2011), al evaluar dosis de N (0, 40, 80 y 120 kg N ha⁻¹) en cuatro variedades de camote (*Ipomoea batatas* L. Lam), concluyeron que incrementos en la dosis de fertilización nitrogenada por encima de 80 kg ha⁻¹, no ocasionan un incremento en el rendimiento de isómeros trans-cis-β-caroteno; excepto en la variedad CIP Tanzania. Así mismo, López-Elías *et al.* (2013), reportaron en algas microscópicas *Dunaliella tertiolecta*, tratadas con diferentes concentraciones de nitrato, que la concentración de carotenoides aumenta cuando esta microalga es cultivada en un medio limitado en nitrógeno. Contrario a todo lo expuesto anteriormente, es lo reportado por Kopsell *et al.* (2007) en tejidos de hojas de col de tres variedades tratadas con 6, 13, 26, 52 y 105 mg de N L⁻¹, donde en las tres variedades se observaron incrementos en luteína y β-caroteno al aumentar las dosis de N. En perejil, Chenard *et al.* (2005) reportaron incrementos de luteína, zeaxantina y β-caroteno al incrementar la dosis nitrogenada a 105 mg L⁻¹. Así mismo en lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), con dosis altas de N (200 kg ha⁻¹) se tuvieron incrementos importantes en carotenoides en flores (Biesiada *et al.*, 2008).

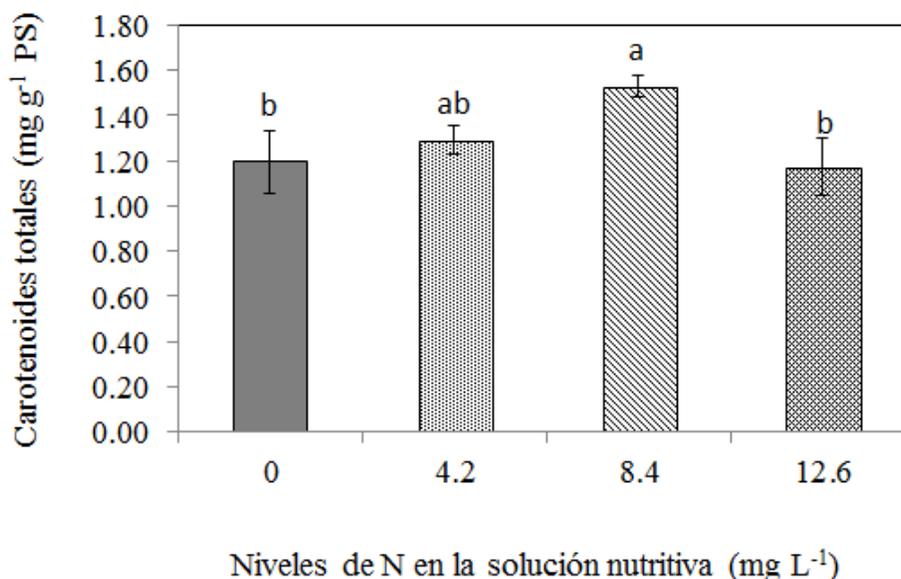


Figura 3.15 Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 36 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.

3.3.3.4. Fenoles totales en hoja y flor

Los compuestos polifenólicos totales (CPF) que se han reportado en cempasúchil comprenden 5.507-5.747 mg EAC (PF) (equivalentes de ácido clorogénico PF) y por el método de cloruro de aluminio 52.6-186.2 mg ERut/100 g (equivalentes de rutina PS) (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

En hojas, de manera general no se evidencia un efecto del N en la concentración de fenoles totales; se obtuvo la media más alta en el tratamiento testigo, y éste no es estadísticamente diferente a los resultados obtenidos con las dosis altas de N evaluadas (4.2 y 8.4 mg L⁻¹) (**Figura 3.16A**). La ausencia de N en la solución nutritiva durante la fase de floración, redujo de manera significativa la concentración de fenoles totales; mientras

que, por el contrario, la más alta concentración de fenoles totales se tuvo con 4.2 mg L⁻¹, superando al tratamiento testigo en 36.37 % (**Figura 3.16B**).

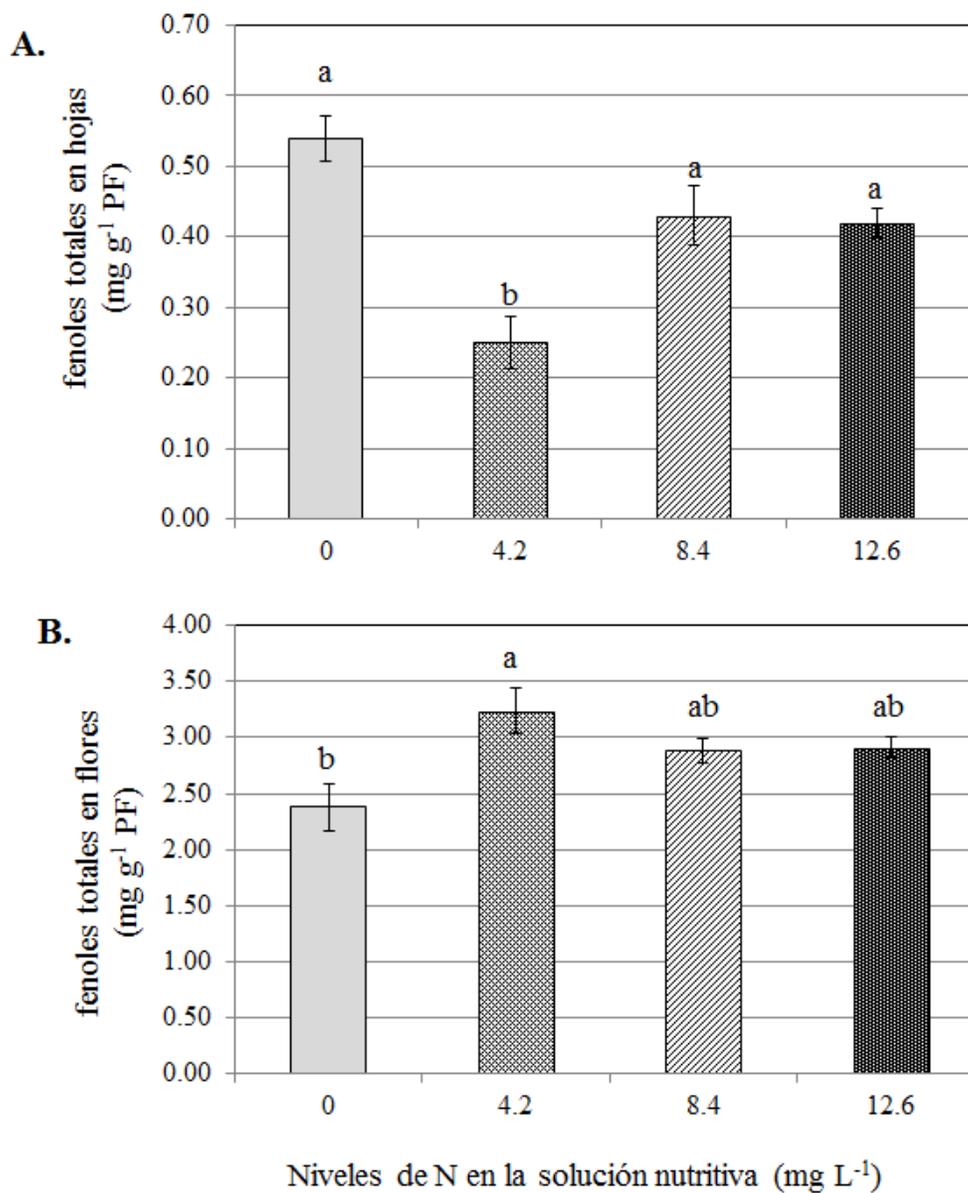


Figura 3.16 Fenoles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 30 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias ± DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

Mohd *et al.* (2011) al evaluar cuatro niveles de fertilización nitrogenada (0, 90, 180 y 270 kg ha⁻¹) en *Labisia pumila* Blume, encontraron la mayor producción de fenoles totales en ausencia de nitrógeno, resultados similares a los aquí obtenidos en hojas. De la misma manera, en el estudio realizado por Biesiada *et al.* (2008) en lavanda, se presentó una disminución en el contenido de polifenoles bajo el efecto de la alta fertilización nitrogenada. También en mostaza de la India (*Brassica juncea* Cross), al incrementar la dosis de nitrógeno de 10 mM a 25 mM en la solución nutritiva, las concentraciones de compuestos fenólicos totales disminuyen (Li *et al.*, 2008).

En contraste a los resultados antes descritos, en arándano (*Vaccinium myrtillus*) estudiaron los efectos de la fertilización nitrogenada, la aplicación de una dosis moderada de N no afectó de manera significativa la concentración y el contenido de compuestos fenólicos; con altas dosis de N, se incrementaron estas variables en forma significativa (Witzell y Shevtsova, 2004). De la misma manera Giletto *et al.* (2013) en papa concluyeron que el incremento de fenoles totales se relaciona de manera positiva con el aumento en la dosis de N. Stumpf *et al.* (2015) investigaron la influencia de la fertilización nitrogenada en la concentración de fenoles totales en trigo (*Triticum aestivum*), concluyen que al incrementar la dosis de N, los compuestos fenólicos aumentan.

3.3.3.5. Flavonoides totales en hoja y flor

En hojas la concentración de flavonoides totales en plantas del tratamiento testigo fue menor en 10.77 % a la registrada en hojas de plantas tratadas con la dosis más altas de nitrógeno; sin embargo, la diferencia entre éstos no es significativa. Así también, las concentraciones foliares de flavonoides totales en el testigo no difieren estadísticamente al resto de tratamientos (**Figura 3.17A**). En contraste, en hojas *Labisia pumila* Blume, los

flavonoides disminuyen al incrementar la fertilización nitrogenada a 90,180 y 270 kg ha⁻¹, en 42, 43 y 57 % respectivamente, en comparación con el testigo (Mohd *et al.*, 2011).

En flores, la más alta concentración de flavonoides totales se tuvo en el tratamiento con dosis de N de 4.2 mg L⁻¹, superando estadísticamente al resto de los tratamientos (**Figura 3.17B**). Del mismo modo, en caléndula (*Calendula officinalis*), las flores de plantas que recibieron las dosis más altas de nitrógeno (120 y 160 kg ha⁻¹), tuvieron contenidos inferiores de compuestos fenólicos (Król, 2011). Felgines *et al.* (2000) consideran que la deficiencia de nitrógeno aumenta el contenido de flavonoides en plantas.

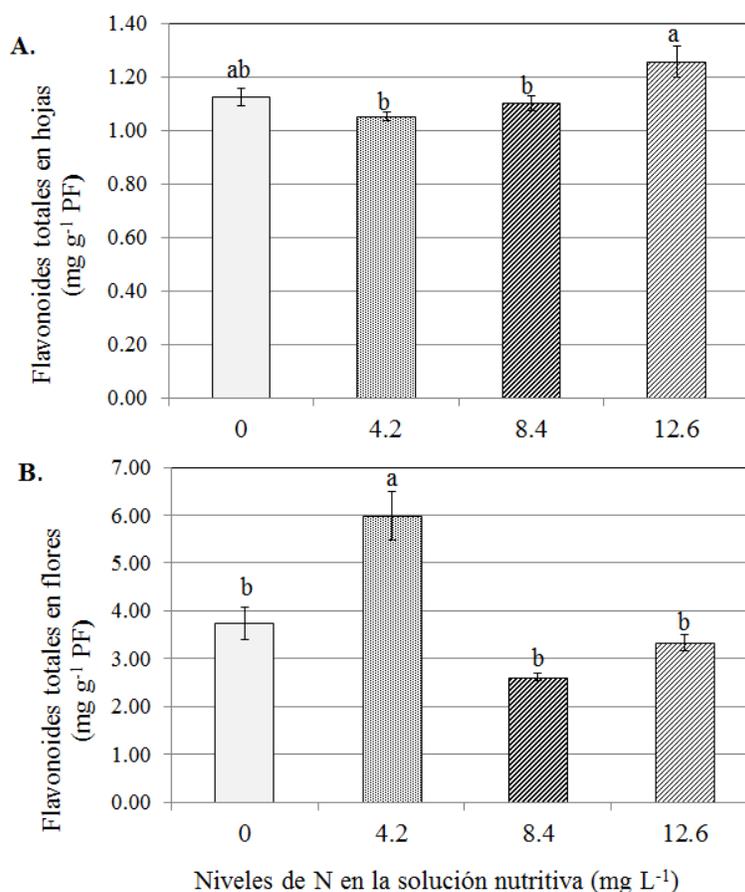


Figura 3.17 Flavonoides totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 30 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias ± DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

3.3.3.6. Actividad antioxidante en hoja y flor

La actividad antioxidante en hojas a los tres tiempos de incubación no presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (**Cuadro 3.6**).

Cuadro 3.6 Actividad antioxidante en hojas de cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva.

Nitrógeno en la solución (mg L ⁻¹)	Actividad Antioxidante (mg g ⁻¹)		
	15 min	30 min	60 min
0	0.71±0.01 a	0.62±0.01 a	0.64±0.01 a
4.2	0.69±0.00 a	0.59±0.01 a	0.61±0.01 a
8.4	0.71±0.01 a	0.59±0.01 a	0.60±0.01 a
12.6	0.69±0.04 a	0.60±0.02 a	0.61±0.02 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Por otra parte, la actividad antioxidante medida en flores a los 30 y 60 min de incubación, muestra que el tratamiento con la dosis más alta de N superó al testigo en cada caso en 34.92 y 31.0 % respectivamente, siendo estos tratamientos diferentes estadísticamente (**Cuadro 3.7**).

Cuadro 3.7 Actividad antioxidante en flores de cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno.

Nitrógeno en la solución (mg L ⁻¹)	Actividad Antioxidante (mg g ⁻¹)		
	15 min	30 min	60 min
0	0.62±0.19 a	0.63±0.04 b	0.58±0.04 b
4.2	0.76±0.19 a	0.86±0.00 a	0.87±0.00 a
8.4	0.92±0.01 a	0.81±0.03 a	0.86±0.00 a
12.6	0.91±0.01 a	0.85±0.01 a	0.76±0.09 ab

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Caso contrario en nuestro estudio en hojas y flores (**Cuadros 3.4 y 3.5**); Biesiada *et al.* (2008) al investigar con tres dosis de N (50, 100 y 200 kg ha⁻¹) en lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) la actividad antioxidante en flores, se encontró que la mayor actividad antioxidante se tuvo con la dosis de N de 50 kg ha⁻¹, siendo significativamente superior al

resto de los tratamiento. En hojas, se tuvo efecto positivo de la dosis de N en la actividad antioxidante; es decir superior en la dosis más alta de N. Mientras tanto en hojas de mostaza de la India (*Brassica juncea* Coss) tratada con dos niveles de nitrógeno en la solución nutritiva (10 y 25 mM) y tres niveles de azufre (0.5, 1 y 2 mM), concluyen que al incrementar las aplicaciones de N disminuye la actividad del radical DPPH (Li *et al.*, 2008).

3.3.3.7. Rendimiento de aceites esenciales en hoja y flor

El rendimiento de aceites esenciales tanto en hojas como en flores (**Figuras 3.18A y 3.18B**) mostró una relación negativa con la dosis suministrada de N en la solución nutritiva; esta respuesta probablemente sea debida a la reducción en la acumulación de materia seca cuando las plantas fueron desabastecidas de N en el tratamiento testigo.

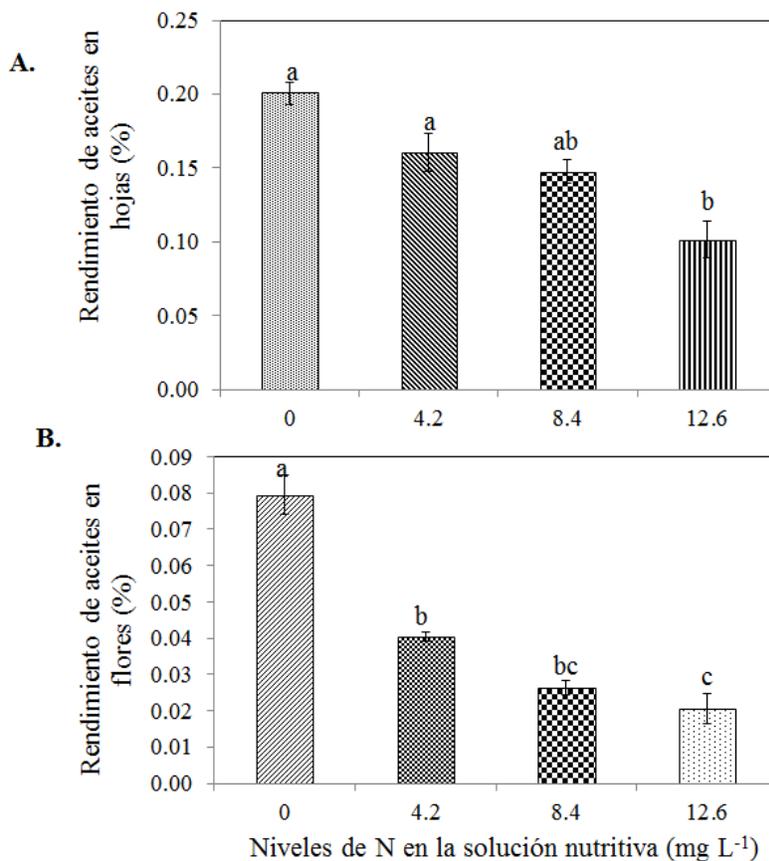


Figura 3.18 Rendimiento de aceites en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes niveles de N en la solución nutritiva en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

El rendimiento de aceites esenciales en hojas de plantas tratadas con N en una concentración de 12.6 mg L⁻¹ de solución nutritiva, fue inferior al testigo en 50.47 %. De la misma manera en flores, el rendimiento de aceites con la dosis más alta de N evaluada representó solo el 25.97 % del rendimiento registrado en el testigo (**Figura 3.18**). Caso similar se reporta en un estudio con tomillo, donde las plantas fueron tratadas con las dosis nitrogenadas 0, 45, 90 y 135 kg ha⁻¹; se concluyó que las dosis de 45 y 90 kg ha⁻¹

fueron los más eficaces en términos de rendimiento de aceite esencial (Baranauskiene *et al.*, 2003).

Por el contrario, en un estudio con *Lippia* los mayores rendimientos de aceites esenciales se obtuvieron en las accesiones de *L. origanoides* con la aplicación más alta de N suministrada a partir de urea (100 kg ha^{-1}) (Zambrano *et al.*, 2013), esta respuesta la atribuyen a las condiciones naturales de alta fertilidad del suelo del estudio. También en albahaca al fertilizar las plantas con N a razón de 300 kg ha^{-1} , se incrementó el rendimiento de aceite en hojas (Sifola y Barbieri, 2006). Singh *et al.* (2008) en *Tagetes minuta*, reportan como nivel óptimo de fertilización con N, 150 kg ha^{-1} , dosis con la cual se supera el rendimiento de aceites obtenido con dosis nitrogenadas de 0, 50 y 100 kg ha^{-1} , en 142, 49, y 23 %, respectivamente.

3.3.3.8. Composición de aceites esenciales por órgano

Los tiempos de retención de los compuestos de aceites esenciales identificados en hojas, flores, tallos y raíces se presentan en el **Cuadro 3.8**. La técnica GS/MS permitió identificar 15 compuestos diferentes en los distintos órganos de la planta de *T. erecta* var. Inca. Serrato-Cruz *et al.* (2014), en *Tagetes terniflora* HBK para la producción de aceite esencial, evaluaron la distancia entre plantas (15×80 , 30×80 y 60×80) y la fertilización con N a partir de urea (0, 60 y 120 kg ha^{-1}), e identificaron once componentes principales del aceite esencial entre ellos están E-tagetona, *cis*-tagetenona, *trans*-tagetenona, dihidrotagetona, *trans*- β -ocimeno, propenil anisol, sphenol, allil anisol, Z-tagetona y limoneno; estos resultados solo coinciden en dos componentes con los identificados en este estudio (**Cuadro 3.8**). Por otro lado, en otro estudio realizado mediante el análisis por GC-MS se identificaron 18 componentes en el aceite esencial de *Tagetes erecta*, entre los

principales se tuvieron β -cariofileno, limoneno, metileugenol, (E)-ocimeno, piperitona, piperitenona, α -terpinoleno siendo algunos similares a nuestro estudio (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

Cuadro 3.8 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes niveles de nitrógeno.

Compuesto	Tiempo de retención, min	Compuesto	Tiempo de retención, min
Cariofileno	19.36	Terpinoleno	13.4
α -Pinoeno	9.93	1,3,8-Mentatrieno	13.9
D-Limoneno	12.15	β -Farneseno	19.96
Trans- β -ocimeno	12.32	Piperitona	16.47
Cis- β -ocimeno	12.54	Eugenol	18.37
D-Germacreno	20.86	Careno	13.34
β -Mirceno	11.36	2-Norpineno	19.54
		Decano	11.44

Componentes del aceite esencial de hojas. Se identificaron diez componentes diferentes en este órgano, sólo cariofileno, α -pinoeno, D-limoneno, Trans- β -ocimeno y cis- β -ocimeno fueron consistentes en todos los tratamientos (**Figura 3.19**).

La concentración porcentual de los compuestos fueron muy variables en todos los tratamientos. Se presentaron diferencias estadísticas significativas en cariofileno, donde la dosis más alta de N adicionada ocasionó un incremento en éste en 130 %, en comparación con el testigo. Por el contrario, el α -pinoeno a esta dosis de N, tuvo una

concentración de significativamente inferior al resto de los tratamientos, el mismo comportamiento se presentó en D-limoneno. La mayor concentración de trans- β -ocimeno fue en el tratamiento de N de 4.2 mg L⁻¹ en la solución nutritiva y el cis- β -ocimeno fue en el testigo y la dosis de 8.4 mg L⁻¹ donde se presentó la mayor concentración porcentual de este compuesto (**Figura 3.19**). En ajedrea de jardín (*Satureja hortensis*) en respuesta al carbonato de calcio y niveles de N (0, 50, 100 y 150 kg ha⁻¹); se observó por efecto principal de nitrógeno, que el α -pineno aumenta al incrementar la dosis de N; coincidentemente con lo aquí observado en hojas (Mumivand *et al.*, 2011). El limoneno se encontró en tres variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.), con dosis altas de N (300 kg ha⁻¹), obteniéndose porcentajes de éste de 13.2 % en la variedad Mostruoso mammoth, 17.3 % en Genovese profumatissimo y en Napoletano a foglia di lattuga el 16.8 % (Sifola y Barbieri, 2006).

En los constituyentes de aceites de hojas, D-germacreno, β -mirceno, existieron diferencias estadísticas significativas siendo en ausencia de N y con la dosis baja de éste, respectivamente, donde se registró de manera exclusiva su presencia. Los componentes terpinoleno, 1,3,8-mentatrieno y β -farneseno; por el contrario, solo a dosis altas de N fueron identificados(**Figura 3.19**).

En un estudio con especies y accesiones de *Lippia*, Zambrano *et al.* (2013), mencionan que las diferencias en la composición química de los aceites estuvieron más asociadas a la especie y accesión que con la aplicación de gallinaza y urea (dosis de N de 50 y 100 kg ha⁻¹). En orégano al fertilizar con cuatro niveles de N (0, 1, 2, 4 y 8 g de sulfato de amonio por maceta), el α -pineno coincidió con este estudio, la mayor concentración de éste se tuvo en el testigo con 0.39 % (Omer, 1999). También este compuesto se encontró en mayor proporción en albahaca lima (*Ocimum americanum* L.) al utilizar nitrato de amonio (33.5 % de N) (Omer *et al.*, 2008).

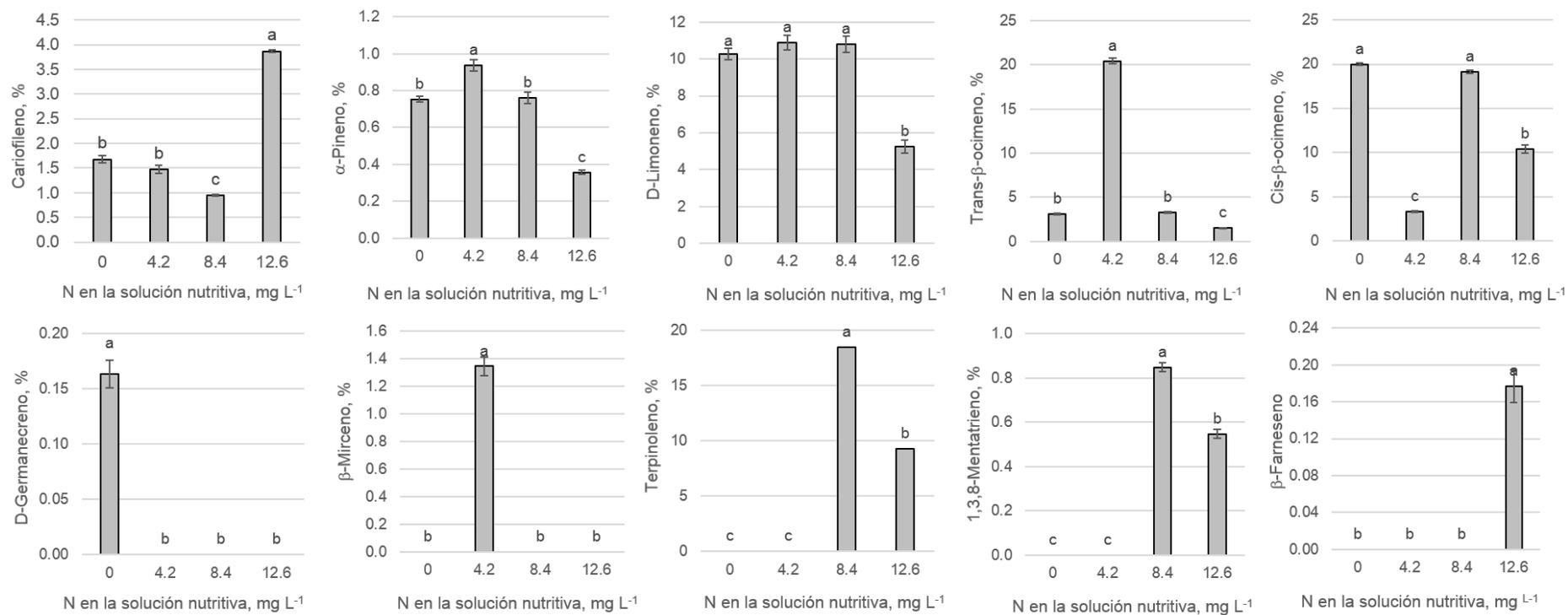


Figura 3.19 Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de hojas de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Componentes del aceite esencial en cabezuelas. Se identificaron once componentes diferentes en este órgano, de éstos, no estuvieron presentes en hojas piperitona, eugenol, terpinoleno y careno (**Figura 3.20**).

Las concentraciones de cariofileno, Trans- β -ocimeno, D-limoneno, β -farneseno y Eugenol no fueron estadísticamente diferentes entre tratamientos. El único componente que mostró diferencias estadística significativa y se presentó en todos los tratamientos fue el cis- β -ocimeno, donde el testigo tuvo la mayor concentración porcentual (**Figura 3.20**).

El terpinoleno, careno, β -mirceno y D-germacreno solo se presentaron en alguno de los tratamientos de estudio siendo muy variable entre ellos, es decir el terpinoleno y β -mirceno se presentó en el tratamiento consistente en la dosis de N de 8.4 mg L^{-1} , careno en el tratamiento con 12.6 mg L^{-1} y en el testigo el D-germacreno (**Figura 3.20**).

Sharafzadeh *et al.* (2011), reportan en tomillo (*Thymus vulgaris* L.) que al evaluar diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno (0, 50 y 100 mg kg^{-1} como urea o como nitrato de amonio), los componentes identificados que coinciden con nuestro experimento son α -pineno, terpinoleno y D-Germacreno. De la misma manera, Omer *et al.* (2008), usaron nitrato de amonio (33.5 % de N), sulfato de amonio (20.5 % de N) y urea (46 % de N), y diferentes fechas de aplicación, como resultado obtuvieron mayor concentración de eugenol con un 39.42 % con nitrato de amonio. También en tres variedades de albahaca al suministrar diferentes concentraciones de nitrógeno (0, 100 y 300 kg ha^{-1}) en las variedades “Mostruoso mammoth” y “Genovese profumatissimo” se tuvieron 16.5 y 20.9 % de eugenol respectivamente cuando se fertilizó con la dosis más alta de N (Sifola y Barbieri, 2006).

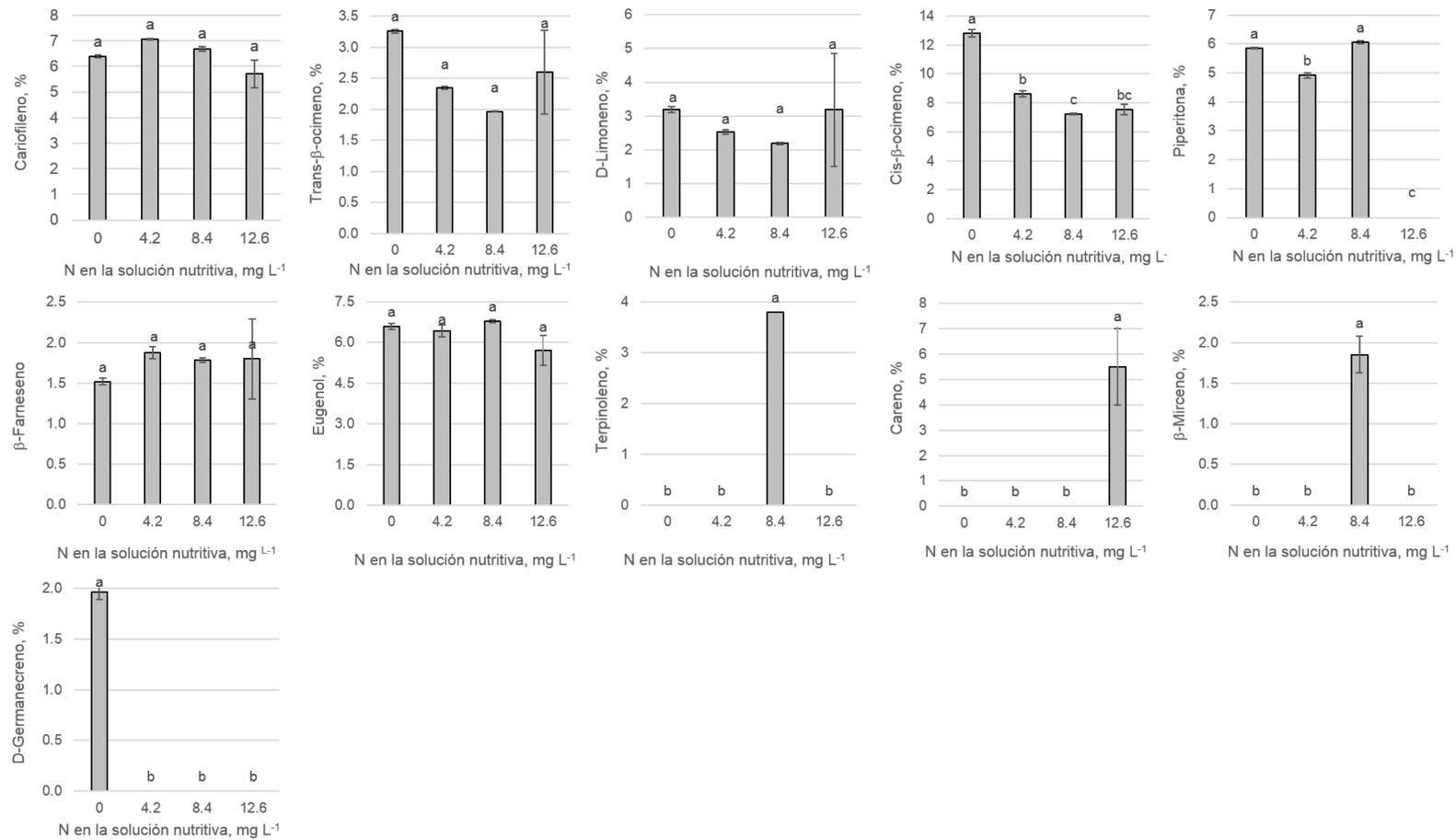


Figura 3.20 Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de cabezuelas de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Componentes del aceite esencial en tallos. Solo se presentaron cuatro compuestos en este órgano (**Figura 3.21**). La mayor concentración de cariofileno fue en el tratamiento consistente en la dosis de N de 8.4 mg L⁻¹, piperitona y β-farneseno en el tratamiento de 4.2 mg L⁻¹, estos tres componentes fueron consistentes en todos los tratamientos y presentaron diferencias estadísticas significativas (**Figura 3.21**).

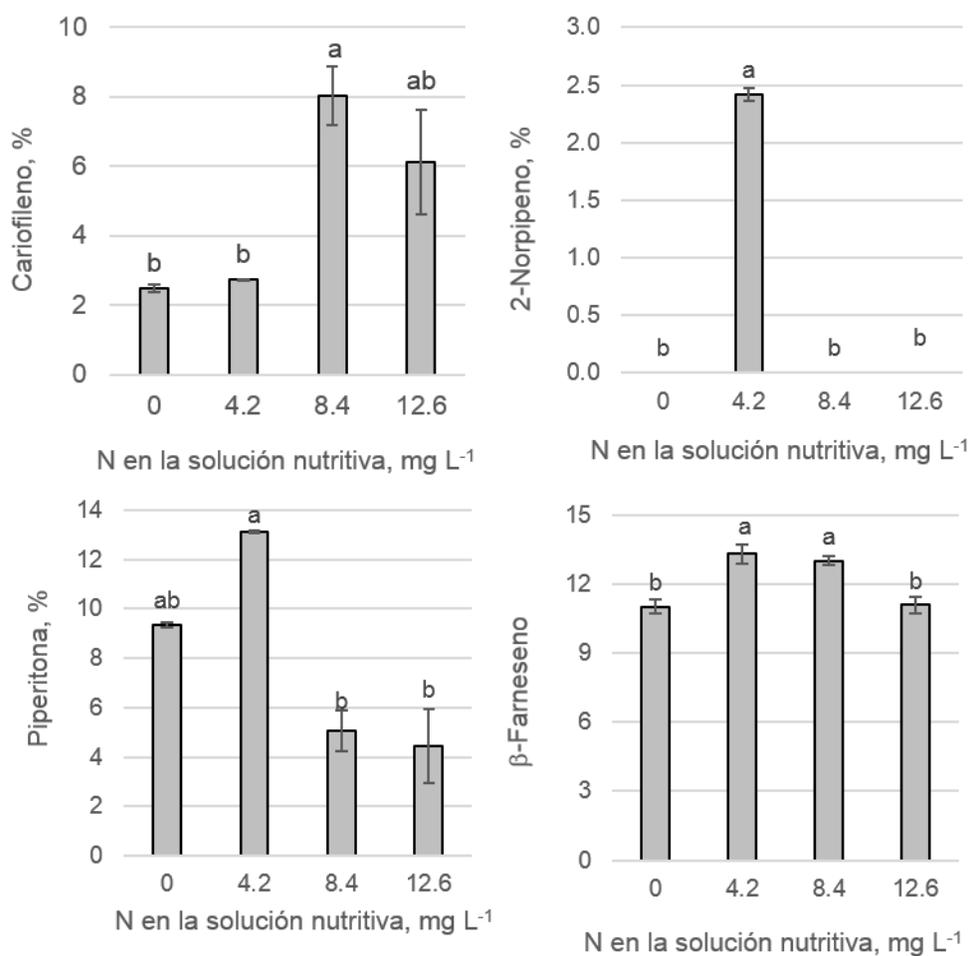


Figura 3.21 Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de tallos de plantas de campasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias ± DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Componentes del aceite esencial en raíces. Se identificaron cinco compuestos, siendo el decano encontrado de manera exclusiva en éste órgano (**Figura 3.22**).

El único compuesto presente en todos los tratamientos fue el β -farneseno, pero no hubo diferencias estadísticas significativas (**Figura 3.22**).

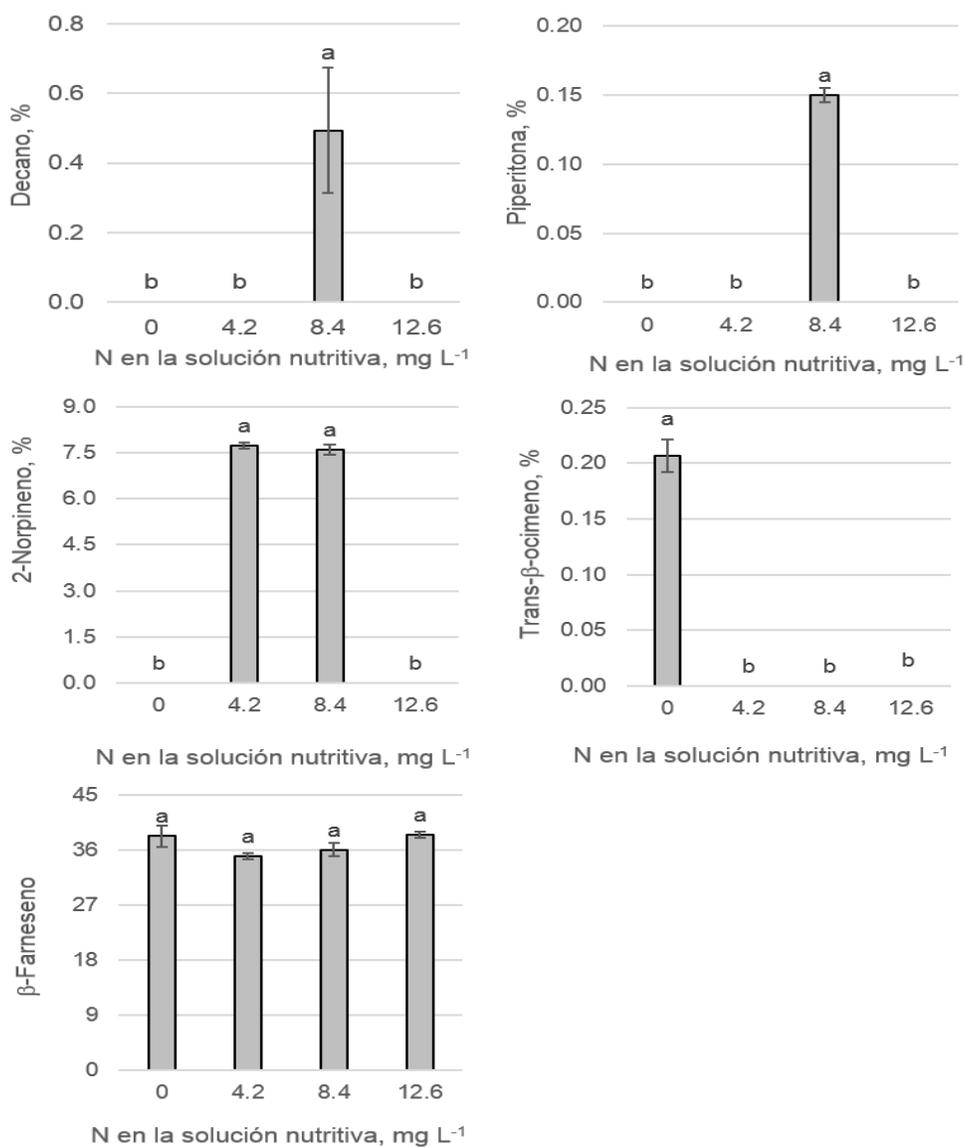


Figura 3.22 Concentración porcentual de los componentes del aceite esencial de raíces de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes concentraciones de N en la solución nutritiva durante la fase de floración. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

3.3.3.9. Concentración de clorofilas

Uno de los parámetros biofísicos más relacionados con la cantidad de nitrógeno en la planta es el contenido de clorofila, dado que la mayor parte de este elemento se encuentra en las moléculas de clorofila (Taiz y Zeiger, 2002); de esta forma, una deficiencia de N está altamente correlacionada con la reducción de clorofila y de manera notoria asociada con un cambio en la reflectancia del verde (Costa *et al.*, 2001; Brizuela *et al.*, 2007) y por consiguiente la nutrición de las plantas y la producción.

En la **Figura 3.23** se presentan las concentraciones foliares de clorofilas bajo los diferentes niveles de N; éstas fueron estadísticamente diferentes entre tratamientos. Las plantas testigo tuvieron una concentración de clorofilas inferior; representando solo el 50.06, 51.10 y 50.69 % de las clorofilas a, b y total registradas en hojas de plantas tratadas con N a razón de 12.6 mg L⁻¹ en la solución nutritiva (**Figura 3.23**). De manera similar Porto *et al.* (2013), mencionan en maní forrajero (*Arachis pinto*) que las concentraciones de clorofilas a, b y total en respuesta a cuatro dosis de N (0, 40, 80 y 120 kg ha⁻¹), fueron más altas con la dosis de N de 120 kg ha⁻¹. En albaca (Polityca y Golcz, 2004), con diferentes dosis de N (0, 1.35 y 1.80 g por planta), al evaluar en dos cosechas (en el comienzo y plena floración) el contenido de clorofilas a y b, encontraron que la fertilización nitrogenada tuvo un efecto significativo en el incremento de ambas clorofilas.

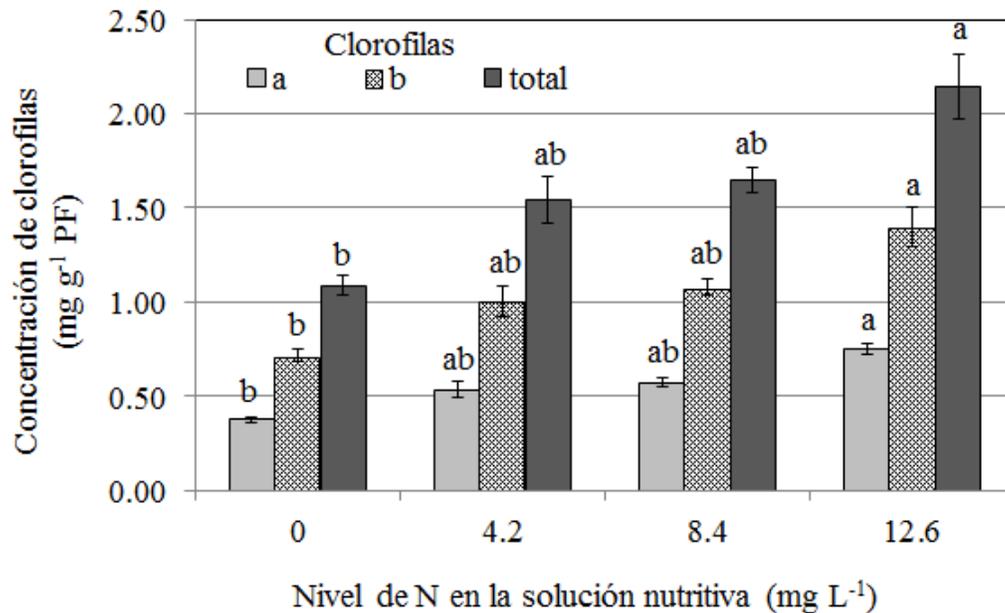


Figura 3.23 Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 30 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

El aumento en el contenido de clorofila, con la fertilización nitrogenada, ha sido informada por muchos trabajos: Warren *et al.* (2005) en hojas de *Pinus pinaster* Aiton, Boussadia *et al.* (2010) en *Olea europea*, Seneweera *et al.* (2011) en hojas de arroz, Mohdet *et al.* (2011) en *Labisia pumila* Benth. & Hook.f., probablemente debido a que el nitrógeno favorece la absorción de Mg, lo que influencia la síntesis de clorofila (Gárate y Bonilla, 2009).

3.3.3.10. Azúcares totales en hojas y flores

La acumulación de carbohidratos en las plantas tiene la función de proveer monosacáridos que son utilizados durante el crecimiento y desarrollo. La sacarosa es el principal producto de la fijación de carbono durante la reacción fotosintética y el almidón es el principal carbohidrato de reserva en las plantas (Avigad y Dey, 1997).

En la **Figura 3.24A** se presentan los resultados del análisis foliar de azúcares totales, donde no hay efecto significativo de las dosis de N evaluada. Por el contrario, Baranauskienė *et al.* (2003), al evaluar cuatro concentraciones de N (0, 45, 90 y 135 kg ha⁻¹) en tomillo (*Thymus vulgaris*), realizaron dos cosechas durante su producción y en la segunda cosecha se presentó un incremento significativo de azúcares totales y sacarosa con dosis bajas de N. También en plántulas de *Labisia pumila*, los carbohidratos totales no estructurales fueron influenciados por los niveles de nitrógeno aplicados, éstos disminuyeron al incrementar la fertilización de N, siendo el valor más bajo en 270 kg N ha⁻¹ en un 27 % (Mohd y Jaafar, 2011).

De la misma manera que en hojas, en flores la concentración de azúcares totales no fue estadísticamente diferente entre tratamientos (**Figura 3.24B**). Chaín *et al.* (2002) indican que los azúcares estructurales y no estructurales son almacenados en tallos, hojas y pétalos proveen la energía necesaria para que la flor complete su desarrollo. Mientras, Huber (1994) menciona que hay un movimiento de azúcar a la planta provocado por la transpiración, lo cual lleva a una acumulación de azúcares en tallos y hojas, para posteriormente ser trasladado a los pétalos vía floema. Por tanto, los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía, necesaria para la inflorescencia en procesos fisiológicos y bioquímicos. Las concentraciones adecuadas de carbohidratos en las inflorescencias en el momento de la cosecha son determinantes en la vida en florero, debido a que la apertura de la inflorescencia es un proceso que requiere una fuente de energía (Aparecida-Almeida *et al.*, 2011).

Del Pozo *et al.* (2002), reportaron en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) que el contenido de carbohidratos solubles estructurales está determinado por factores metabólicos relacionados con la fotosíntesis, respiración y distribución de nutrimentos que

pueda generar cada planta y puede modificarse con el nivel de nitrógeno en la planta y su estado fisiológico, siempre que las condiciones climáticas no sean una limitación.

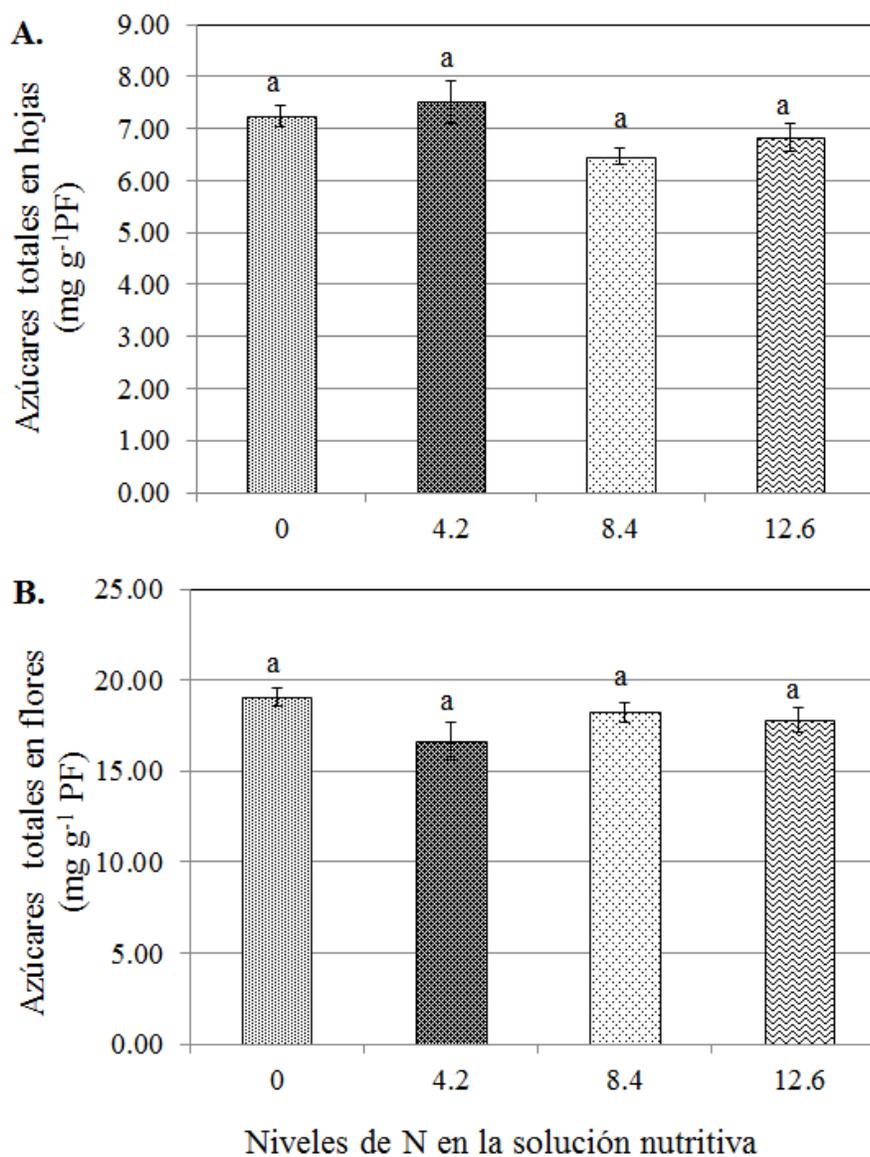


Figura 3.24 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 30 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

3.3.3.11. Aminoácidos libres totales en hojas y flores

En hojas, las concentraciones de N altas (8.4 y 12.5 mg L⁻¹) ocasionaron incremento significativo de la concentración de aminoácidos libres totales; siendo el tratamiento testigo el de menor concentración de aminoácidos (**Figuras 3.25A**). En inflorescencias (**Figura 3.25B**), también se observa un efecto positivo de la adición de N en la solución nutritiva; particularmente con la dosis más baja evaluada (4.2 mg L⁻¹). En el mismo sentido, Trejo-Téllez *et al.* (2005), al asperjar urea foliar al 2 %, reportan que la concentración de aminoácidos libres se relaciona en una forma positiva tanto en hojas como en raíces en espinaca. Así también Meuriot *et al.* (2003) reportan en alfalfa en dos experimentos; en el primero se evaluaron dos tratamientos N óptimo y N-limitado; en el segundo experimento, se evaluaron concentraciones decrecientes de NH₄NO₃ (1000, 250, 100 o 50 mM). En ambos experimentos las concentraciones de aminoácidos en raíces pivotantes aumentaron al incrementar las dosis de N. En un estudio con árboles de manzano (*Malus domestica* Borkh), se seleccionaron cuatro árboles de después de la aplicación de urea foliar al 3 %, los aminoácidos en hojas, corteza y raíces incrementaron significativamente después de la aplicación de urea comparado con los valores del control. A los 4 días de aplicación se registraron las mayores concentraciones de aminoácidos en hojas y corteza, y en raíces se produjo diez días después de la aplicación (Dong *et al.*, 2002).

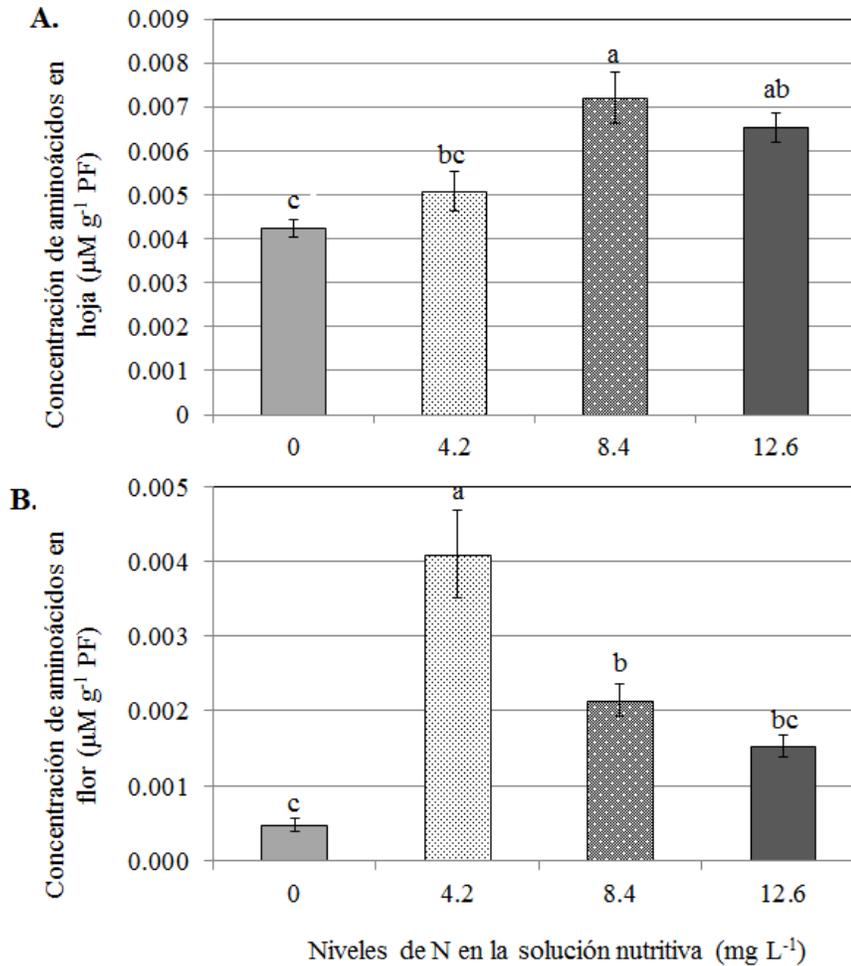


Figura 3.25 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 30 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

3.3.3.12. Proteínas solubles totales en hojas y flores

Contrario a la concentración de aminoácidos, la concentración foliar de proteínas solubles disminuye al incrementar la dosis de N; es decir, con la ausencia de N y la dosis baja de este elemento en la solución nutritiva (4.2 mg L⁻¹) se registró la concentración más alta de proteínas solubles en hojas (**Figura 3.26A**). En flores, la concentración de proteínas en

plantas testigo representó el 75.38 % de la concentración registrada en el tratamiento con la dosis de N de 12.6 mg L⁻¹; siendo esta diferencias no significativas (**Figura 3.26B**).

De manera coincidente a lo aquí reportado en hojas, en alfalfa Meuriot *et al.* (2003), reportan los efectos de variación de NH₄NO₃ en dos experimentos; en el primero se evaluaron dos niveles de nitrógeno (N óptimo y N-limitado); en el segundo experimento, evaluaron concentraciones decrecientes de NH₄NO₃ (1000, 250, 100 o 50 mM). En ambos experimentos las concentraciones de proteínas solubles aumentaron en los tratamientos con nitrógeno limitado.

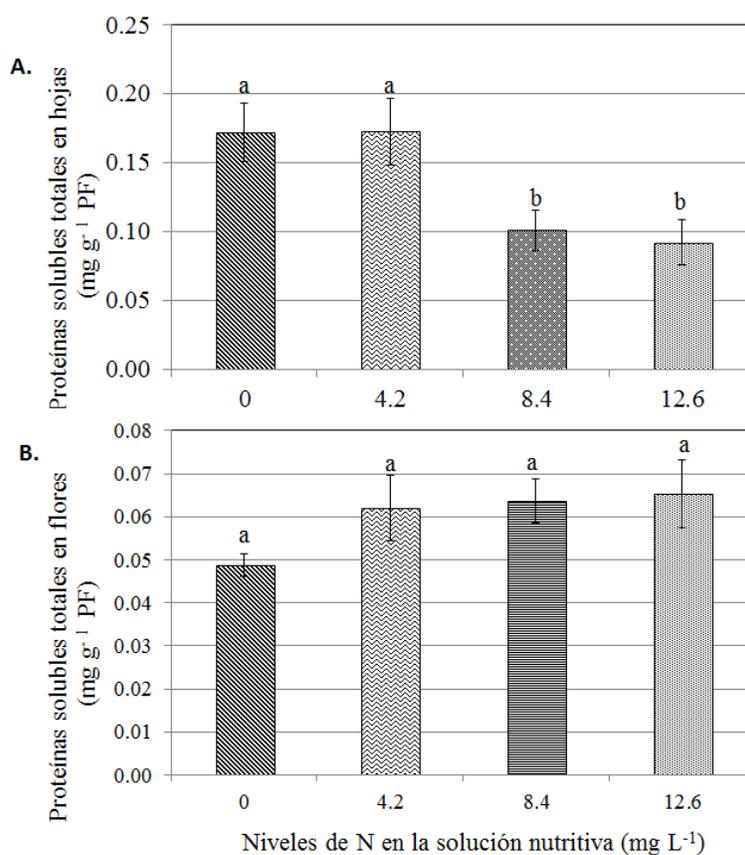


Figura 3.26 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 30 días con diferentes niveles de nitrógeno en fase de floración. Medias ± DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

3.4. CONCLUSIONES

La dosis alta de N en la solución nutritiva (12.6 mg L^{-1}) incrementó de manera significativa el número de ramas primarias, número y diámetro de cabezuelas 45 días después del inicio de tratamientos. Esta respuesta se reflejó en consecuencia en un incremento significativo en las biomásas secas de cada uno de los órganos y de la planta completa.

En hojas, el incremento en la dosis de N se asoció con reducción de luminosidad y croma; es decir se tuvieron hojas más oscuras y menos brillantes. En flores, solo la luminosidad fue influenciada significativamente por los tratamientos, siendo la dosis de N de 8.4 g L^{-1} con la que se tuvieron cabezuelas más brillantes.

En hojas, la dosis de N se relacionó de manera positiva con la concentración de N, P, K, Mg y S; particularmente en el caso de Mg y S en el intervalo de N de 0 a 8.4 mg L^{-1} . Esta tendencia se observa también en la concentración de N en flores; así también de N, P, K, Ca, Mg y S en tallos. De manera general, las tendencias observadas en concentración de macronutrientes coincidieron con las observadas en la acumulación de éstos en hojas, flores y tallos. En raíces no existió efecto de los tratamientos en la concentración de macronutrientes; por el contrario, las acumulaciones de N, K y Mg en raíces incrementaron en el testigo.

La concentración de carotenoides en flores fue incrementada con la dosis de N de 8.4 mg L^{-1} , mientras que la de fenoles totales y flavonoides en hojas con 0 y 12.6 mg L^{-1} respectivamente, en flores con dosis de 4.2 mg L^{-1} tanto en fenoles como flavonoides.

El mayor porcentaje en el rendimiento de aceites fue en el tratamiento testigo. Por otra parte, se identificaron un total de 15 compuestos en los diferentes órganos de la planta. En flores fue el órgano donde se presentó mayor número de compuestos diferentes con respecto al total, seguido de hojas, tallos y raíces. La dosis de 12.6 mg L^{-1} ocasionó la mayor concentración de cariofileno y β -farneseno en hojas; el D-limoneno en flores. En

tallos y raíces no fueron favorables los incrementos en la dosis nitrogenada en lo que a síntesis de aceites esenciales se refiere.

La mayor concentración de proteínas en hojas se mostró en el testigo; por el contrario la concentración de aminoácidos libres totales incrementó en el intervalo de N en la solución nutritiva de 0 a 8.4 mg L⁻¹.

3.5. LITERATURA CITADA

- Adams F. 1980. Interactions of phosphorus with other elements in soil and plants. In: Dinauer RC (eds.). The role of phosphorus in agriculture; America Society of Agronomy: Madison, WI, pp. 655-680.
- Alcántar GG, Sandoval VM. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial. Núm. 10. SMCS. Chapingo, México. 150 p.
- Anuradha K, Pampapathy K, Narayana N. 1990. Effect of nitrogen and phosphorus on flowering, yield and quality of marigold. *Indian Journal of Horticulture* 47: 353-357.
- Aparecida-Almeida EF, Duarte de Oliveira-Paiva P, de Oliveira-Lima LC, Cordero-Silva F, Fonseca J, Alves-Nogueira D. 2011. Calla lily inflorescences postharvest: pulsing with different sucrose concentrations and storage conditions. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras 35(4):657-663.
- Ashraf M, Ali Q, Rha ES. 2005. The effect of applied nitrogen on the growth and nutrient concentration of Kalonji (*Nigella sativa*). *Aust. J. Exp. Agric.* 45:459-463.
- Avigad G, Dey PM. 1997. Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. In: Dey PM, Harbone JB. *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego. pp. 143-204.
- Baj T, Kowalski R, Swiatek L, Modzelewska M, Wolski T. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of the Essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis* L. ssp. *Officinalis*). *Annales UMCS, sec. DDD, Pharmacia* 23(3):55-61.
- Baranauskienė R, Venskutonis RP, Viskelis P, Drambrauskienė E. 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 51(26): 7751-7758.
- Biesiada A, Sokół-Letowska A, Kucharska A. 2008. The effect of nitrogen fertilization on yielding and antioxidant activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 7(2):33-40.
- Bijimol G, Singh AK. 2001. Effect of spacing and nitrogen on flowering, flower quality and post-harvest life of gladiolus. *J. Appl. Hort.* 3 (1):48-50.
- Boroujerdnia M, Alemzadeh N. 2007. Effect of different levels of nitrogen fertilizer and cultivars on growth, yield and yield components of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology* 1:47-53.
- Boussadia O, Steppe K, Zgallai H, Ben El Hadj S, Braham M, Lemeur R, Van Labeke MC. 2010. Effects of nitrogen deficiency of leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars "Meski" and "Koroneiki". *Scientia Horticulture* 123: 336-342.
- Bremner MJ. 1965. Total nitrogen. In: Black, C.A. (ed). *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Agronomy 9. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. pp. 1149-1178.
- Brizuela BAP, Alcántar GG, Sánchez GP, Pea k Y, Crumbaugh J, Olive C, Tijerina CL, Maldonado TR. 2007. Establecimiento de índices espectrales en el diagnóstico nutrimental de nitrógeno en maíz. *Agrociencia* 41(8):827-835.

- Castañeda CB, Ramos LLE, Ibáñez VL. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico* 8(1): 56-72.
- Chaín M, Montesinos A, Verdugo G. 2002. Manejo de postcosecha de flores. Boletín INIA No. 82. Temuco, Chile.
- Chenard CH, Kopsell DA, Kopsell DE. 2005. Nitrogen concentration affects nutrient and carotenoid accumulation in parsley. *Journal of Plant Nutrition* 28(2):285-297.
- Chizzola R, Michistschs H, Franz C. 2008. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6897-6904.
- Crawford NM, Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3(10):1360-1385.
- Costa C, Dwyer LM, Dutilleul P, Stewart DW, Ma BL, Smith J. 2001. Inter-relationships of applied nitrogen, spad, and yield of leafy and nonleafy maize genotypes. *Journal Plant and Nutrition* 24: 1173-1194.
- Del Pozo PP, Herrera RS, García M. 2002. Dinámica de los contenidos de carbohidratos y proteína bruta en el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con aplicación de nitrógeno y sin ella. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 36:275-280.
- Dong S, Cheng L, Scagel CF, Fuchigami LH. 2002. Nitrogen absorption, translocation and distribution from urea applied in autumn to leaves of Young potted apple (*Malus domestica*) trees. *Tree Physiology* 22:1305-1310.
- Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7(18): 3188-3192.
- Fageria VD. 2001. Nutrient interactions in crop plants. *Journal of Plant Nutrition* 24(8):1269-1290.
- Felgines C, Texier O, Morand C, Manach C, Scalbert A, Regeat F, Remesy C. 2000. Bioavailability of the flavone naringenin and its glycosides in rats. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: 1148-1154.
- Gárate A, Bonilla I. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. Capítulo 8. *In: Azcón-Bieto J, Talón M. Fundamento de Fisiología Vegetal. Barcelona: McGraw-Hill Interamericana. pp. 113-129.*
- García-Hernández JL, Valdez-Cepeda LD, Servín-Villegas R, Troya-Dieguéz E, Murillo-Amador B, Rueda-Puente EO, Rodríguez-Ortiz JC, Magallanes-Quintanar R. 2007. Interacciones nutrimentales y normas de diagnóstico de nutrimento compuesto en un cultivar semidomesticado de *Capsicum frutescens*. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 13(2):133-140.
- Gaviola S, Lipinski M. 2008. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento y el color de cultivares de ajo (*Allium sativum*) colorado. *Ciencia e Investigacion Agraria* 35(1):67-75.
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 21: 253-268.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(3): 227-281.
- Giletto C, Monti MC, Ceroli P, Echeverría H. 2013. Efecto de la fertilización con nitrógeno sobre la calidad de tubérculos de papa (var. Innovator) en el sudeste Bonaerense. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 14(2): 217-222.
- Gliessman SR. 2002. Agroecología. *Procesos Ecológicos en la Agricultura Sostenible*, LICOCAT, Turrialba, Costa Rica, 359 p.
- Guadarrama-Quiróz A, Escalante Estrada JA, Rodríguez-González MT, Sánchez García P, Sandoval-Castro E. 2007. Biomasa, proteína, taninos y rendimiento en función del nitrógeno. *Terra Latinoamericana* 25 (2): 169-175.
- Höfner R, Vásquez-Moreno L, Abou-Mandour AA, Bohnert HJ, Schmitt JM. 1989. Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 803-810.

- Huber C. 1994. Estudio de tratamientos de conservación de postcosecha de flores de gladiolo (*Gladiolus hybridus*). Tesis de Maestría. Lie. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 121 p.
- Hussain AI, Anwar F, Iqbal T, Bhatti IA. 2011. Antioxidant attributes of four *Lamiaceae* essential oils. *Pak. J. Bot.* 43(2): 1315-1321.
- Ibarra EE, Pacheco S M, García MR, San Miguel ChR, Ramírez VG, Soto HRM. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(4): 241-246.
- Kähkönen M, Anu I, Heinonen C, Heinonen M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49: 4076-4082.
- Kawasaki T. 1995. Metabolism and physiology of calcium and magnesium. *In: Mutsuo T, Kumasawa K, Ishii R, Ishihara K, Hirata H (eds.). Science of the Rice Plant; Food and Agricultural Policy Research Center: Tokyo, Japan. 2: 412-419.*
- Khalid AK. 2013. Effect of potassium uptake on the composition of essential oil content in *Calendula officinalis* L. flowers. *Emir. J. Food Agric.* 25(3): 189-195.
- Kopsell DA, Kopsell DE, Curran CJ. 2007. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:900-907.
- Król B. 2011. The effect of different nitrogen fertilization rates on yield and quality of marigold (*Calendula officinalis* L. Tokaj) raw material. *Acta Agrobotanica* 64(3):29-34.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(4): 726-732.
- Li J, Zhu Z, Gerendás J. 2008. Effects of nitrogen and sulfur on total phenolics and antioxidant activity in two genotypes of leaf mustard. *Journal of Plant Nutrition* 31:1642-1655.
- Little AC. 1975. Research note off on a tangent. *J. Food Sci.* 40(2):410-411.
- López-Eliás JÁ, Fimbres-Olivarría D, Medina-Juárez LA, Miranda-Baeza A, Martínez-Córdova LR, Molina-Quijada DMA. 2013. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* em médios limitados de nitrógeno. *Phyton (B. Aires)* 82: 23-30.
- Magallanes-Quintanar R, Valdez-Cepeda RD, Blanco-Macías F, Márquez-Madrid M, Ruiz-Garduño RR, Pérez-Veyna O, García Hernández JL, Murillo-Amador B, López-Martínez JD, Martínez-Rubín de Celis E. 2005. Compositional nutrient diagnosis in nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 6:78-89.
- Marschner P. 2005. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 3ra ed. United States of America, 645 p.
- Martins FT, Santos MH, Polo M, Barbosa LCA. 2007. Effects of the interactions among macronutrients, plant age and photoperiod in the composition of *Hyptis suaveolens* (L.) Point essential oil from Alfenas (MG), Brazil. *Flavour Fragr. J.* 22:123-129.
- Masclaux DC, Daniel VF, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141-1157.
- Mercado-Mercado G, de la Rosa-Carrillo L, Wall-Medrano A, López-Díaz JÁ, Álvarez-Parrilla E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas em México. *Nutrición Hospitalaria* 28(1):36-46.
- Meuriot F, Avice JC, Decau ML, Simon JC, Lainé P, Volenec JJ, Ourry A. 2003. Accumulation of reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. *Plant Science* 165:709-718.
- Minolta K. 2007. Precise color communication. Kónica Minolta Sensing, Inc. Japan. 59 p.
- Mohd HI, Hawa JZE, Asmah R, Zaharah RA. 2011. Effects of nitrogen Fertilization on Synthesis of primary and Secondary Metabolites in three varieties of Kacip Fatimah (*Labisia Pumila* Blume). *International Journal of Molecular Sciences* 12(8):5238-5254.
- Mohd HI, Jaafar HZE. 2011. Involvement of carbohydrate, protein and phenylalanine ammonia lyase in up-regulation of secondary metabolites in *Labisia pumila* under various CO₂ and N₂ levels. *Molecules* 16:4172-4190.
- Moore S, Stein W.H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211: 893-906.

- Mumivand H, Babalar M, Hadian J, Tabatabaeei MF. 2011. Plant growth and essential oil content and composition of *Satureja hortensis* L. cv. Saturn in response to calcium carbonate and nitrogen application rates. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(10):1859-1866.
- Nagata M, Yamashita I. 2002. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39: 925-928.
- Nanyonga SK, Opoku AR, Lewu FB, Oyedeji OO, Singh M, Oyedeji AO. 2013. Antioxidant activity and cytotoxicity of the leaf and bark extracts of *Tarhonanthus camphorates*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 377-383.
- Omer EA. 1999. Response of wild Egyptian oregano to nitrogen fertilization in a sandy soil. *Journal of Plant Nutrition* 22(1): 103-114.
- Omer EA, Elsayed AGA, El-Lathy A, Khattab ME, Sabra AS. 2008. Effect of the nitrogen fertilizer forms and time of their application on the yield of herb and essential oil of *Ocimum americanum* L. *Herba Polonica* 54(1): 34-46.
- Omidbaigi R, Dadman B, Fattahi F. 2008. Influence of nitrogen fertilization on the herb yield, essential oil content and composition of *Tagetes minuta* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 11(1): 45-52.
- Pérez-Gutiérrez RM, Hernández-Luna H, Hernández-Garrido S. 2006. Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *J. Chil. Chem. Soc.* 51(2): 883-886.
- Politycka B, Golcz A. 2004. Content of chloroplast pigments and anthocyanins in the leaves of *Ocimum basilicum* L. depending on nitrogen doses. *Horticulturae* 16(1):23-29.
- Porto SRM, Deitos FD, Vieira PJ, Bonomo P, Silva SL, Nascimento CC, Rodriguez BPH, Santos BM. 2013. Chlorophyll and carbohydrates in *Arachis pintoi* under influence of water regimes and nitrogen fertilization. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42(6): 388-394.
- Qasim M, Ahmad I, Nadeem A. 2003. Influence of various nitrogen levels on growth and biomass of *Jasminum sambac*. *Pak. J. Agri. Sci.* 40: 3-4.
- Quintanilla CMX. 2007. Caracterización colorimétrica y morfométrica de capítulos florales y lígulas de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula* a través de análisis digital de imágenes (ADI) y análisis de la dimensión fractal (ADF). Tesis de Licenciatura de la Universidad de la Sabana. Facultad de Ingeniería. Ingeniería de producción Agroindustrial. Chía puente del común. 66 p.
- Rahmani NT, Taherkhani T, Zandi P, Moradi A. 2011. Effect regulated deficit irrigation and nitrogen levels on flavonoid content and extract performance of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Annals of Biological Research* 3(6): 2624-2630.
- Romero F, Martínez MMC, Petril MT. 2007. Factores precosecha determinantes de la calidad y conservación en postcosecha de productos agrarios. Disponible en: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/65/906/65906.pdf>. Consultado 10 de abril de 2015.
- Rubio R. 2002. Conectando el fósforo del suelo con la planta. In: Simposio Enfoque Sistemático de la Fertilización Fosfórica. Facultad de Agronomía, UBA. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 16:19-24.
- Said-Al Ahl HAH, Hasnaa S.A, Hendawy SF. 2009. Effect of potassium humate and nitrogen fertilizer on herb and essential oil of oregano under different irrigation intervals. *Ocean Journal of Applied Sciences* 2(3):1943-2429.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Scherer R, Teixeira GH. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil method. *Food Chemistry* 112: 654-658.
- Sedano-Castro G, González-Hernández VA, Saucedo-Veloz C, Soto-Hernández M, Sandoval-Villa M, Carrillo-Salazar JA. 2011. Rendimiento y calidad de frutos de calabacita con altas dosis de N y K. *Terra Latinoamericana* 29(2):133-142.
- Seneweera SP, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y. 2011. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environment Experimental Botany* 71: 128-136.
- Serrato MA. 2004. Cempoalxóchil diversidad biológica y usos. *Ciencia y Desarrollo en Internet*. Julio-Agosto 1-6.

- Serrato-Cruz MA, Díaz-Cedillo F, Hernández-Medina D, Curiel-Rodríguez A. 2014. Two agronomical aspects of *Tagetes terniflora* HBK for essential oil production. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* 381:9-13.
- Sharafzadeh S, Alizadeh O, Vakili M. 2011. Effect of nitrogen sources and levels essential oil componentes of *Thymus vulgaris* L. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(10):885-889.
- Sifola MI, Barbieri G. 2006. Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Sci. Hortic.* 108:408-413.
- Singh M, Tripathi RS, Singh S, Yassen M. 2008. Influence of row spacing and nitrogen levels on herb and essential oil production and oil quality of *Tagetes minuta* L. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 17(3):251-254.
- Southgate DA. 1976. Determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers. LTD. London. 105 p.
- Steiner A. 1984. The universal nutrient solution. *In: I. S. O. S. C. Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture, the Netherlands.* pp. 633-649.
- Stojanova A, Primova T, Anastassov Ch. 2000. Effect of mineral fertilization on the essential oil composition of *Tagetes patula* L. from Bulgaria. *J. Essent. Oil Res.* 12(5): 609-612.
- Stumpf B, Yan F, Honermeier B. 2015. Nitrogen fertilization and maturity influence the phenolic concentration of wheat grain (*Triticum aestivum*) *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178:118-125.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cumming Publishing Company, CA, USA. 565 p.
- Toledo T, Nagem TJ, Rocha CM, Marciano CL, Magalhaes NM, Stringheta PC, Queiroga De Lima E, Kling De Moraes GH, Da Silvia Viera H. 2004. Biological properties of natural dyes. *Ars. Pharmaceutica* 45: 5-20.
- Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC, Rodríguez-Mendoza MN, Alcantar-González G. 2005. Fertilización foliar con urea en la partición de nitrógeno en espinaca. *Terra Latinoamericana* 23(4):495-503.
- Trejo-Téllez LI, Peralta-Sánchez MG, Gómez-Merino FC, Rodríguez-Mendoza MN, Serrato-Cruz MA, Arévalo-Becerril AE. 2013. Cloruro de sodio sobre biomasa seca y absorción de cationes macronutrientes en cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 979-990.
- Ukom AN, Ojimelukwe PC, Alamu EO. 2011. All trans-cis β -carotene content of selected sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) varieties as influenced by different levels of nitrogen fertilizer. *African Journal of Food Science* 5(3):131-137.
- Warren CR, McGrath JF, Adams MA. 2005. Differential effects of N, P and K on photosynthesis and partitioning of N in *Pinus pinaster* needles. *Annals of Forest Science* 62: 1-8.
- Waterman PG, Mole S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 238 p.
- Wilkinson SR, Grunes DL, Summer ME. 1999. Nutrient interactions in soil and plant nutrition. *In: Summer, ME (ed.) Handbook of Soil Science; CRC Press: Boca, FL.* pp. 89-112.
- Witzell J, Shevtsova A. 2004. Nitrogen-induced changes in phenolics of *Vaccinium myrtillus* implications for interaction with a parasitic fungus. *Journal of Chemical Ecology* 30(10):1937-1956.
- Yang MS, Tawaha ARM, Lee KD. 2005. Effects of ammonium concentration on the yield, mineral content and active terpene components of *Chrysanthemum coronarium* L. in a hydroponic system. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2:170-175.
- Zambrano MEL, Buitrago FLA, Durán GLA, Sánchez OMS, Bonilla CCR. 2013. Efecto de la fertilización nitrogenada en el rendimiento y la composición de los aceites esenciales de especies y accesiones de *Lippia*. *Acta Agronómica* 62(2):129-135.

CAPÍTULO IV. INTENSIDAD LUMINOSA Y LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y DE CALIDAD DE *Tagetes erecta* Linn.

4.1. INTRODUCCIÓN

Algunos de los factores más comunes que producen estrés en las plantas, ya sea por deficiencia o exceso, son: el nitrógeno y la irradianza lumínica (Pérez-Asseff *et al.*, 2007).

El entendimiento de los procesos de absorción y asimilación del nitrógeno en las plantas y su regulación ha avanzado considerablemente en la última década, por ejemplo, la luz afecta la absorción de nitrato como una señal de activación de transportadores, a su vez la enzima nitrato reductasa afecta la fotosíntesis de la planta y el crecimiento (Kaiser y Huber, 2001). Si se altera la fotosíntesis por cambios en la intensidad de luz, la absorción de nitrato debe cambiar para mantener el suministro de N a la velocidad necesaria; por el contrario, si el consumo de nitrato se altera se debe recuperar la tasa fotosintética. En *Petiveria alliacea*, Pérez-Asseff *et al.* (2007) al evaluar el efecto del nitrógeno en distintas concentraciones (0, 56, 112, 224 y 448 ppm) y la irradianza en diferentes niveles (100, 20.5 y 2.6 %), observan que la eficiencia fotosintética es mayor en hojas de plantas con mayor disponibilidad de N y ambientes parcialmente sombreados. En trigo (*Triticum aestivum* L. cv. 'EM18'), la absorción de nitrato en raíz incrementa en presencia de luz y disminuye en la oscuridad, fenómeno posiblemente estimulado a través de un azúcar de señalización en el floema (Li *et al.*, 2013).

En microalgas se ha demostrado que en función de la irradiación, la absorción NO_3^- sigue una curva de saturación similar a la curva de luz de la fotosíntesis. A largo plazo, la irradiación afecta las tasas de crecimiento y la demanda de N en la planta, en plantas cultivadas con altas irradiaciones existen mayores tasas de crecimiento, altas tasas de absorción de nitrato y capacidad de reducción, y viceversa (Cedergreen, 2003).

Forde (2000) reporta que los azúcares son las moléculas más importantes en la estimulación y captación de nitrato, mientras que los aminoácidos como la glutamina y asparagina regulan negativamente su absorción.

Las señales ambientales como la luz y disponibilidad de nutrimentos son factores que regulan los genes implicados en la asimilación de nitrógeno. La luz sirve para la asimilación de nitrógeno inorgánico a través del suministro de esqueletos de carbono producidos durante la fotosíntesis. Además, los sustratos y los productos de asimilación de nitrógeno pueden actuar como mensajeros que median la regulación de sus genes biosintéticos (Oliveira *et al.*, 2001).

La asparagina sintetasa (AS) y glutamina sintetasa (GS) son enzimas que sintetizan a los aminoácidos libres más abundantes en el xilema y en el floema, respectivamente. La expresión de los genes que codifican a estas enzimas, está regulada recíprocamente por la luz y metabolitos (Ngai y Coruzzi, 1998); por lo anterior, la expresión génica de AS y GS sirven como una herramienta para el estudio de efectos positivos y negativos regulados por la luz y en la expresión de genes de plantas que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno.

La luz puede afectar la expresión del gen de la planta actuando directamente a través de la activación del fitocromo o de manera indirecta a través de cambios de metabolitos de carbono (Oliveira *et al.*, 2001).

En los capítulos II y III de esta tesis de investigación se evaluaron diferentes porcentajes de sombreado (0, 30, 50 y 70 %) y diferentes niveles de N (0, 4.2, 8.4 y 12.6 mg L⁻¹) en experimentos independientes y se argumentó sobre la importancia que tiene el sombreado y el nitrógeno en las variables morfológicas, fisiológicas y de calidad de cempasúchil (*T. erecta*). Por tanto, en este experimento el objetivo fue evaluar de manera conjunta los factores irradiación y nitrógeno, para lo cual se probaron dos porcentajes de

sombreado (0 y 70 %) y tres niveles de nitrógeno (8.4, 12.7 y 16.9 mg L⁻¹ de N). Esta investigación resulta importante, en virtud de que no existe información sobre la respuesta fisiológica, morfológica y de calidad de *T. erecta* a los factores combinados del sombreado y la aplicación de N.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal

La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero. Plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca se transplantaron en macetas de plástico negras de 1 L de capacidad, conteniendo como sustrato una mezcla de tezontle: perlita (60:40, v:v) (Figura 4.1).



Figura 4.1 Material vegetal, plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) y establecimiento del experimento.

4.2.2. Manejo del experimento

Después del trasplante, las plántulas se regaron con agua durante cuatro días; posteriormente el riego se dio con una solución nutritiva Steiner al 5% (Steiner, 1984) complementada con micronutrientes a partir del producto comercial Tradecorp AZ™, en las concentraciones descritas por Trejo-Téllez *et al.* (2013). El pH de la solución nutritiva se ajustó a 5.5 y ésta se suministró mediante un sistema de riego por goteo. Se realizaron dos riegos por día en cada maceta, cada uno de ellas con un volumen de 150 mL. La solución nutritiva se almacenó en un tanque de 200 L al cual se conectaron tubos de PVC hidráulico de 1" (2.54 cm). Cada gotero tuvo adaptadores de dos salidas, cada una con un tubín y estaca que se colocaron en cada maceta. Los riegos se programaron usando un temporizador y abastecidos con bombas de ½ HP. A los 31 días después del trasplante (ddt) se realizó una poda, desbotonando todas las plantas.

4.2.3. Diseño de tratamientos

Al inicio de la floración (33 ddt), se inició la aplicación de seis tratamientos, considerando un diseño de tratamientos factorial 3X2 donde los factores de estudio fueron: concentración de nitrógeno en la solución nutritiva a tres niveles (8.47, 12.71, 16.94 mg L⁻¹) y sombreado (porcentaje) a dos niveles (0 y 70 %). En el **Cuadro 4.1** se presenta los valores promedio de temperatura, intensidad luminosa y humedad relativa que se tuvo en el invernadero bajo las dos condiciones de sombreado. Cada uno de los tratamientos tuvo 40 repeticiones. La unidad experimental consistió en una maceta con una planta.

Cuadro 4.1 Temperaturas, humedades relativas e intensidades luminosas máxima, mínima y media en ($^{\circ}\text{C}$, % y $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente) registradas en el invernadero durante esta fase de investigación.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)						
Mes	0 %			70 %		
	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media
Septiembre	23.7	18.5	21.0	27.2	20.6	24.1
Octubre	23.2	17.4	19.8	27.3	15.9	23.2
Noviembre	19.1	14.6	17.1	17.1	13.6	15.7

Humedad relativa (%)						
Mes	0 %			70 %		
	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media
Septiembre	72.1	54.9	62.7	68.8	42.3	52.0
Octubre	66.5	36.5	55.7	65.8	28.4	45.4
Noviembre	73.1	51.1	60.3	75.4	53.3	62.6

Intensidad luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)						
Mes	0 %			70 %		
	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media
Septiembre	968.1	471.3	785.1	330.7	52.2	247.9
Octubre	1014.1	1.1	696.0	299.5	1.1	203.2
Noviembre	885.2	191.8	560.2	237.8	58.8	170.0

4.2.4. Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente al azar.

4.2.5. Variables evaluadas

A continuación se describen las variables morfológicas que se midieron 15, 30 y 80 días después del inicio de tratamientos.

4.2.5.1. Altura de rama lateral

La altura se determinó desde la superficie del sustrato hasta el botón más alto de la rama lateral, utilizando un flexómetro graduado en cm.

4.2.5.2. Número de ramas primarias

Se cuantificó el número de ramas desde la base de la planta hasta la parte apical.

4.2.5.3. Número de ramas secundarias

Se cuantificó el número de ramas desde la base de la rama primaria hasta la parte apical.

4.2.5.4. Número de botones cerrados

Se cuantifico el número de botones totales presentes en cada planta.

4.2.5.5. Número de botones semiabiertos

Se determinó el número de botones semiabiertos es decir, aquellos en los que empezaba asomarse las lígulas en el botón.

4.2.5.6. Número de cabezuelas abiertas

Se cuantificó el número de botones completamente abiertos por planta.

4.2.5.7. Diámetro de cabezuelas

Se midió con un vernier digital (cm), en las cabezuelas abiertas por planta.

A continuación se describen las variables fisiológicas evaluadas.

4.2.5.8 Biomasa seca y concentración nutrimental

Después de 40 días de tratamiento, cuatro plantas por tratamiento fueron seccionadas en flores, hojas, tallos y raíces (se eliminó el sustrato y a éstas se les enjuagó con agua destilada) y secadas en una estufa de aire forzado a 70 °C por 72 h para determinar la biomasa seca. Las muestras secas se molieron en un molino de acero inoxidable marca Wiley Modelo 4 con malla tamiz de 40. La concentración de N total se determinó empleando el método Semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965) utilizando ácido sulfúrico-salicílico para la digestión de las muestras. Las concentraciones de P y K fueron determinadas por digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). La lectura de los extractos obtenidos después de la digestión y filtrado se determinó en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma ICP-OES Varian modelo 725-ES.

4.2.5.9. Carotenoides totales en flores

La cosecha de las inflorescencias fue manual cuando éstas alcanzaron su mayor apertura (38 ddt). Las inflorescencias cosechadas se secaron en estufa de aire forzado (Felisa, FE291AD, México) a 40 °C por 48 h; posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Ohaus, Adventurer™Pro, Estados Unidos de América), se molieron finamente y se almacenaron en recipientes de plástico con tapa a 4 °C, para su posterior análisis. La técnica de extracción de carotenoides totales, se realizó con el método descrito por

Nagata y Yamashita (2002). De cada muestra se pesaron 150 mg de polvo fino de inflorescencias secas de cempasúchil, se agregaron 10 mL de una mezcla de acetona-hexano (4:6, v/v) y se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 min. Enseguida se leyeron las absorbancias de los extractos de diez repeticiones en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan[®], Estados Unidos de América) a 453, 503, 645 y 663 nm de longitud de onda; para la estimación de carotenoides totales, los valores obtenidos se sustituyeron en la siguiente fórmula (Nagata y Yamashita, 2002):

$$\text{Carotenoides totales (mg/100 mL)} = (0.216)(A_{663}) - (1.220)(A_{645}) - (0.304)(A_{505}) + (0.452)(A_{453})$$

4.2.5.10. Flavonoides totales

La preparación de la muestra (secado, molido y almacenamiento) se realizó de la misma manera como se describió en el apartado anterior para carotenoides. Se realizó una complementación entre las metodologías empleadas por Ghasemi *et al.* (2009), Ebrahimzadeh *et al.* (2008) y Nanyonga *et al.* (2013). En donde se pesaron 75 mg de hojas previamente molidas, se adicionaron 1.5 mL de metanol al 80 % y se incubó durante 1 h a 70 °C. Cuando el material se enfrió, se procedió a centrifugar durante 20 min, a 4 °C y 15000 rpm. En un tubo de reacción se colocaron 200 µL del sobrenadante, se agregaron 600 µL de metanol al 80 %, 40 µL de cloruro de aluminio al 10 %, 40 µL de acetato de potasio 1 M y 1120 µL de agua destilada y se agitó al agregar cada solución. Se dejó reposar la solución durante 40 min a temperatura ambiente y a oscuridad y se leyó en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA) a 451 nm. Para el cálculo de la cuantificación de flavonoides se utilizó la ecuación obtenida a partir de la elaboración de la curva estándar con quercetina.

4.2.5.11. Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Esta evaluación se realizó después de 38 días del inicio de tratamientos con diferentes niveles de nitrógeno y porcentajes de sombreado. Para esta determinación, cuatro plantas por tratamiento seleccionadas al azar se seccionaron en flores, hojas, tallos y raíces. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 40 °C por 48 h (Felisa, FE291AD, México), las muestras secas se molieron y cada uno de los órganos de la planta se procesó por separado.

Para la identificación de compuestos se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con un cromatógrafo de gases (HP-6890) acoplado a un detector de masas (HP-5973). Se utilizó una columna HP-5MS (Largo 30m, ID 0.250 mm, film 0.25 μm), velocidad promedio de 36 cm s^{-1} . Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: temperatura inicial de 40 °C por 5 min, primera rampa hasta 150 °C, con un aumento de 9 °C min^{-1} . Se mantuvo por 3 min, segunda rampa hasta 220 °C con un aumento de 9 °C min^{-1} . La fuente de iones a 230 °C, cuadrupolo a 150 °C. Inyector modo splitless, temperatura de 220 °C, 6.97 psi. Como gas acarreador se usó helio y se inyectó 1 μL de las muestras concentradas en forma manual.

Para la identificación de terpenoides se usó el programa Data Analysis y la base de datos que se consultó fue NIST (National Institute of Standards and Technology), basándose en tiempos de retención de cada compuesto y los espectros de masas.

4.2.5.12. Clorofilas a, b y totales

La concentración de clorofilas, se determinó 40 días después de inicio de tratamientos, en hojas frescas por el método de Harbone (1973). La absorbancia de las muestras se

realizó en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb), a longitudes de onda de 663 y 645 nm. Para la estimación de los pigmentos fotosintéticos los valores obtenidos se sustituyeron en las fórmulas siguientes:

$$\text{Clorofila a} = (12.7 \cdot A_{663}) - (2.59 \cdot A_{645})$$

$$\text{Clorofila b} = (22.9 \cdot A_{645}) - (4.70 \cdot A_{663})$$

$$\text{Clorofila total} = (8.2 \cdot A_{663}) + (20.2 \cdot A_{645})$$

4.2.5.13. Azúcares totales en hojas y flores

Esta determinación se hizo al material vegetal tratado por 40 días después de inicio de tratamientos (diferentes niveles de nitrógeno y porcentajes de sombreado), siguiendo el método descrito por Southgate (1976): para la solución madre se trituró 1 g de material vegetal, se agregaron 50 mL de etanol (80 %) y se colocó en la plancha (de 15 a 20 min), se tomó 1 mL de esta solución para llevarse a evaporación en baño María y posteriormente se diluyó en agua destilada (20 mL). En tubos de ensayo se colocó 1 mL de esta dilución, se adicionaron 2 mL de agua destilada y 6 mL de la solución de antrona. Posteriormente los tubos se colocaron en baño María en ebullición por 3 min, se colocaron en agua fría y se leyó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan[®], Estados Unidos de América), usando una curva estándar de glucosa como referencia.

4.2.5.14. Aminoácidos libres totales en hojas y flores

La determinación de aminoácidos libres se realizó en hojas y flores frescas tratadas con tres concentraciones de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado por 40 días después del inicio de tratamientos, mediante una triple extracción etanólica descrita por Geiger *et al.* (1998). Se pesaron 20 mg de material vegetal y se colocaron en tubos de reacción

para las extracciones etanólicas. Las extracciones etanólicas se realizaron incubando las muestras en baño maría durante 20 min a 80 °C; agregando 1 mL de etanol 80 %, 600 µL de etanol al 80 % y 1 mL de etanol al 50 %, respectivamente. La separación de fases se realizó por centrifugación (14,000 rpm, 5 min, 4 °C). La concentración de aminoácidos libres se determinó empleando el método de ninhidrina (Moore y Stein, 1954), las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan[®], Estados Unidos de América) a una longitud de onda de 570 nm. Se utilizó leucina para la elaboración de la curva patrón.

4.2.2.15. Proteínas solubles totales en hojas y flores

Esta evaluación se realizó en tejidos tratados por 40 días considerando los diferentes niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado. La extracción de proteínas fue en hojas y flores de acuerdo con lo descrito por Höfner *et al.* (1989). La cuantificación se hizo en 0.5 g de material vegetal con solución de negro amino, la lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro con una absorbancia de 640 nm (Thermo Scientific, Multiskan[®], Estados Unidos de América). Se utilizó albúmina de suero bovino para la elaboración de la curva estándar.

4.2.8. Análisis de resultados

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente de acuerdo con el diseño experimental empleado, usando análisis de varianza (ANOVA) del paquete estadístico SAS (SAS, 2011). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Variables morfológicas

4.3.1.1. Efecto principal del factor nitrógeno

Después de 15 días de tratamiento no se registraron diferencias estadísticas en las variables morfológicas altura de rama, y números de ramas primarias y botones cerrados, como se observa en el **Cuadro 4.2**.

Cuadro 4.2 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva en fase de floración.

Nitrógeno en la solución nutritiva (mg L ⁻¹)	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de botones cerrados
8.47	18.47±1.12a	8.33±0.55 a	4.83±0.57 a
12.71	18.59±1.00 a	8.11± 0.65 a	4.62±0.56 a
16.94	18.73± 0.95 a	8.08± 0.59 a	4.50±0.48 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En la evaluación realizada después de 30 días de tratamientos, solo los parámetros número de ramas secundarias, número de botones cerrados y el diámetro de cabezuelas fueron afectadas por las concentraciones de N en la solución nutritiva (**Cuadro 4.3**). Tanto el número de ramas secundarias como el diámetro de cabezuelas se relacionaron de manera positiva con la dosis nitrogenada. El número de ramas secundarias en el tratamiento con la dosis de N de 16.94 mg L⁻¹ fue mayor en 123 % al valor de éstas registrado para la dosis más baja de N; así también el diámetro de cabezuelas fue superior en 5.86 %. Por el contrario, el número de botones cerrados fue menor a medida que la concentración de N en la solución nutritiva se incrementó.

La evaluación después de 80 días mostró diferencias significativas entre tratamientos fueron el número de ramas secundarias y el diámetro de cabezuela, cuyo grado de

expresión se dio en relación directa con la dosis nitrogenada (**Cuadro 4.4**). El número de ramas fue mayor en poco más de tres con el suministro alto de N, en comparación con el bajo. Por otro lado, el diámetro de cabezuelas aumentó en 12.39 % en el tratamiento con la dosis alta de N, en comparación con el registrado en cabezuelas de plantas tratadas con la baja concentración de N.

Cuadro 4.3 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva en fase de floración.

Nitrógeno en la solución nutritiva (mg L ⁻¹)	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de ramas secundarias	Número de botones cerrados	Número de botones semiabiertos	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuelas
8.47	21.97±0.85a	8.62±0.66 a	0.88±0.45 c	3.00±0.59 a	0.60±0.43 a	2.53±0.48 a	4.95±0.25 b
12.71	21.71±0.89 a	8.21±0.67 a	1.46±0.51 b	2.81±0.56 ab	0.52±0.36 a	2.57±0.37 a	5.01±0.27 b
16.94	21.45±0.87 a	8.20±0.60 a	1.97±0.55 a	2.51±0.59 b	0.46±0.29 a	2.53±0.33 a	5.24±0.23 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 4.4 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 80 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva en fase de floración.

Nitrógeno en la solución nutritiva (mg L ⁻¹)	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de ramas secundarias	Número de botones cerrados	Número de botones semiabiertos	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuelas
8.47	22.76±0.69a	8.25±0.35 a	1.37±0.37 b	4.37±1.33 a	0.12±0.18 a	2.87±0.32 a	5.61±0.21 b
12.71	22.77±0.88a	9.12±0.82 a	2.75±0.99 b	4.37±1.03 a	0.12±0.18 a	2.62±0.26 a	5.81±0.29ab
16.94	22.25±0.72a	9.25±2.25 a	4.50±0.80 a	6.50±0.96 a	0.25±0.23 a	2.75±0.35 a	6.35±0.13 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Król (2011) al evaluar el efecto de diferentes dosis de N (0, 40, 80, 120 y 160 kg ha⁻¹) en *Calendula officinalis* L., concluye que al aplicar la dosis más alta de N se produce una influencia significativa en el número de flores, pero no hubo diferencia significativa en el diámetro de éstas, un resultado contrario a lo observado en la presente investigación.

4.3.1.2. Efecto principal del factor sombreado

Contrario a lo observado en el primer muestreo para el factor nitrógeno, donde no existieron diferencias significativas en variables morfológicas; el sombreado disminuyó significativamente la altura de rama lateral y el número de ramas primarias (**Cuadro 4.5**); observándose que el mayor porcentaje de sombreado redujo la expresión de ambas variables.

Cuadro 4.5 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.

Sombreado (%)	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de botones cerrados
0	19.10±0.93a	8.36±0.56 a	4.68±0.55 a
70	18.10±1.05 b	7.99±0.62 b	4.62±0.53 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Después de 30 días de evaluación, las variables morfológicas altura de rama lateral, número de ramas primarias, número de cabezuelas abiertas y número de botones semiabiertos presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; los valores superiores en las tres primeras variables correspondieron al tratamiento sin sombreado, pero para la última variable la respuesta fue mejor con 70 % de sombreado (**Cuadro 4.6**).

En la evaluación a 80 días se detectaron diferencias estadísticas significativas en altura de rama lateral, número de botones cerrados, número de botones semiabiertos y número de cabezuelas abiertas (**Cuadro 4.7**); con excepción del número de botones semiabiertos, el resto de las variables presentaron valores altos en el tratamiento testigo sin sombreado. Los resultados presentados (Cuadros 4.5, 4.6 y 4.7) en general coinciden con las observaciones realizadas por Guarnaschelli *et al.* (2009), quienes evaluando respuestas en la anatomía y morfología de plántulas de *Eucalyptus globulus*, *E. grandis* y *E. camaldulensis* crecidas en diferentes niveles de luz: pleno sol (C), 50 % (S50) y 75 % (S75), concluyen que la sombra reduce la biomasa foliar y total de todas las plantas de *Eucalyptus*, una disminución que solo es significativa bajo el nivel de restricción más severo S75.

Contrario a los resultados anteriores, Ubaldo-Suárez (2007) reporta que al evaluar el uso de mallas en plantas de *T. erecta* con malla mostraron una altura mayor (27.9 ± 1.96 cm) que las plantas sin malla (24.2 ± 2.58 cm). Con respecto a la evaluación de botones florales obtuvo un número mayor de éstos en plantas con malla que en las plantas sin malla; el diámetro de cabezuelas.

Cuadro 4.6 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.

Sombreado (%)	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de ramas secundarias	Número de botones cerrados	Número de botones semiabiertos	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuelas
0	22.17±0.82a	8.57±0.64 a	1.44±0.59 a	2.77±0.62 a	0.42±0.27 b	2.88±0.37 a	5.02±0.27 a
70	21.25±0.87 b	8.11±0.64 b	1.44±0.51 a	2.77±0.56 a	0.64±0.24 a	2.21±0.34 b	5.11±0.24 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 4.7 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 80 días de tratamiento con dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.

Sombreado (%)	Altura de rama lateral, cm	Número de ramas primarias	Número de ramas secundarias	Número de botones cerrados	Número de botones semiabiertos	Número de cabezuelas abiertas	Diámetro de cabezuelas
0	23.23±0.64a	9.00±0.52 a	3.00±1.13 a	6.08±1.16 a	0.00±0.00 b	3.08±0.26 a	5.92±0.22 a
70	21.93±0.71 b	8.75±0.68 a	2.75±0.86 a	4.08±1.03 b	0.33±0.25 a	2.41±0.26 b	5.93±0.32 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

4.3.1.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado)

Al relacionar el efecto de los diferentes niveles de nitrógeno y sombreado solamente para la variable altura de la rama lateral se tuvieron diferencias estadísticas entre tratamientos a los 15 días de iniciado el tratamiento, el efecto fue negativo con el sombreado (**Cuadro 4.8**).

En el muestreo a los 30 días después del inicio de tratamientos, se observaron tendencias interesantes (**Cuadro 4.9**). En particular, la altura de la rama lateral y el número de ramas primarias, fueron influenciadas negativamente por el sombreado. Por otra parte, el número de ramas secundarias fue estadísticamente superior en las plantas tratadas con la alta concentración de N; independientemente del nivel de sombreado. En lo que respecta al número de botones semiabiertos; los valores más altos se obtuvieron con 0 y 70 % de sombreado en combinación con las dosis de N de 8.47 y 12.71 mg L⁻¹, respectivamente. También se observó un efecto positivo del sombreado en el número de cabezuelas abiertas; es decir, mayor apertura de cabezuela cuando se tuvo menor intensidad luminosa. El diámetro de cabezuela no siguió una tendencia atribuible a los tratamientos dado que, las medias estadísticamente superiores al resto en esta variable se presentan en distintas combinaciones de los tres niveles de N y los dos niveles de sombreado evaluados.

En la evaluación realizada a 80 días después no se registraron, diferencias estadísticas entre tratamientos en el número de ramas primarias, de botones cerrados, de botones semiabiertos, de cabezuelas y diámetro de éstas. Por otro lado, la altura de la rama lateral fue estadísticamente superior en el tratamiento sin sombreado con las dosis de N media y bajas y con el tratamiento de dosis alta de N y el sombreado del 70 %. El número de ramas secundarias incrementó significativamente con la dosis alta de N, independientemente del tratamiento de sombreado (**Cuadro 4.10**).

Salvador *et al.* (2001) evaluaron en encino (*Quercus ilex*) el efecto de la fertilización con tres niveles de N (nula, baja y alta: 0, 45 y 165 mg planta⁻¹, respectivamente), combinados con dos niveles de luz (sin sombreado y 45 % de sombreado). Las plantas sometidas a dosis alta de N presentaron vástagos de mayor altura, diámetro de tallo y mayor área foliar; similar a lo obtenido en el presente estudio cuando se incrementó la dosis nitrogenada de baja a media. Contrario, a lo referido para *Quercus*, en plantas de *T. erecta* sin sombreado se incrementó la altura de rama lateral.

Según Samarakoon *et al.* (1990) evaluando diferentes niveles de sombreado (pleno sol, 42, 59 y 68 %) con una dosis de N moderada (dos aplicaciones separadas de 50 kg ha⁻¹ y dos niveles de sombreado (pleno sol y 59 %) con N alto (50 kg ha⁻¹ cada dos semanas) y N bajo (5 kg ha⁻¹ cada dos semanas), en el crecimiento y la calidad nutritiva de hierba de San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*), grama brasileña (*Axonopus compressus*) y pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), destacan que *S. secundatum* y *A. compressus* presentan características morfológicas similares, concluyen que el sombreado incrementa el valor nutritivo del forraje al incrementar la concentración de N.

Cuadro 4.8 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 15 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva y dos porcentajes de sombreado en la fase de floración.

Nitrógeno en la solución						
	8.47		12.71		16.94	
nutritiva (mg L⁻¹)						
Sombreado (%)	0	70	0	70	0	70
Variable morfológica						
Altura de rama lateral (cm)	18.50±0.96 abc	18.45±1.26 abc	19.61±0.75 a	17.58±0.97 c	19.18±0.99 ab	18.29±0.86 bc
Número de ramas primarias	8.57±0.47 a	8.10±0.60 a	8.35±0.61 a	7.87±0.68 a	8.17±0.59 a	8.00±0.59 a
Número de botones cerrados	4.67±0.57 a	5.00±0.55 a	4.87±0.56 a	4.37±0.54 a	4.50±0.52 a	4.50±0.44 a

Medias ± DE con letras distintas en cada fila indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 4.9 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 30 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado.

Nitrógeno en la solución nutritiva (mg L ⁻¹)	8.47		12.71		16.94	
	Sombreado (%)	0	70	0	70	0
Variable morfológica						
Altura de rama lateral (cm)	22.12±0.81 a	21.82± 0.89 ab	22.51±0.71 a	20.91±0.88 b	21.87±0.92 ab	21.03±0.79 b
Número de ramas primarias	8.80±0.63 a	8.45±0.68 ab	8.70±0.68 a	7.70±0.57 b	8.22±0.59 ab	8.20±0.61 ab
Número de ramas secundarias	0.60±0.42 c	1.17±0.44 bc	1.50±0.49 b	1.42±0.53 b	2.22±0.54 a	1.72±0.54 ab
Número de botones cerrados	3.12±0.62 a	2.87±0.56 a	2.82±0.50 a	2.80±0.62 a	2.38±0.67 a	2.65±0.50 a
Número de botones semiabiertos	0.20±0.23 c	1.00±0.48 a	0.65±0.38 ab	0.40±0.34 bc	0.41±0.25 bc	0.52±0.32 bc
Número de cabezuelas abiertas	3.15±0.38 a	1.92±0.35 d	2.72±0.39 abc	2.42±0.34 bc	2.77±0.31 ab	2.30±0.30 cd
Diámetro de cabezuelas	4.76±0.24 c	5.13±0.22 ab	5.09±0.29 ab	4.94±0.25 bc	5.22±0.22 ab	5.26±0.23 a

Medias ± DE con letras distintas en cada fila indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 4.10 Parámetros morfológicos en cempasúchil después de 80 días de tratamiento con diferentes niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado.

Nitrógeno en la solución nutritiva (mg L ⁻¹)	8.47		12.71		16.94		
	Sombreado (%)	0	70	0	70	0	70
Variable morfológica							
Altura de rama lateral, (cm)		23.77±0.19 a	21.75±0.63 b	23.37±0.90 a	22.17±0.86 b	22.62±0.66 b	21.87±0.83 a
Número de ramas primarias		8.25±0.48 a	8.25±0.25 a	9.25±0.63 a	9.00±1.08 a	9.50±0.29 a	9.00±0.58 a
Número de ramas secundarias		1.25±0.48 b	1.50±0.29 b	2.00±0.71 b	3.50±1.19 ab	5.75±0.25 a	3.25±0.63 ab
Número de botones cerrados		6.25±1.25 a	2.50±0.50 a	5.00±1.08 a	3.75±1.03 a	7.00±1.22 a	6.00±0.71 a
Número de botones semiabiertos		0.00±0.00a	0.25±0.25 a	0.00±0.00 a	0.25±0.25 a	0.00±0.00 a	0.50±0.29 a
Número de cabezuelas abiertas		3.25±0.25 a	2.50±0.29 a	3.00±0.00 a	2.25±0.25 a	3.00±0.41 a	2.50±0.29 a
Diámetro de cabezuelas		5.73±0.13 a	5.48±0.28 a	5.76±0.29 a	5.87±0.34 a	6.27±0.12 a	6.43±0.15 a

Medias ± DE con letras distintas en cada fila indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos

4.3.2. Biomasa seca por órganos

4.3.2.1. Efecto principal del nitrógeno

La determinación de biomasa seca se realizó en un muestreo destructivo después de 40 días del inicio de tratamientos. En la **Figura 4.2** se presentan los resultados obtenidos en función de la concentración de nitrógeno en la solución nutritiva; donde se observa que no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y que la acumulación de biomasa seca tuvo el siguiente orden: flores>tallos>hojas>raíces (**Figura 4.2**).

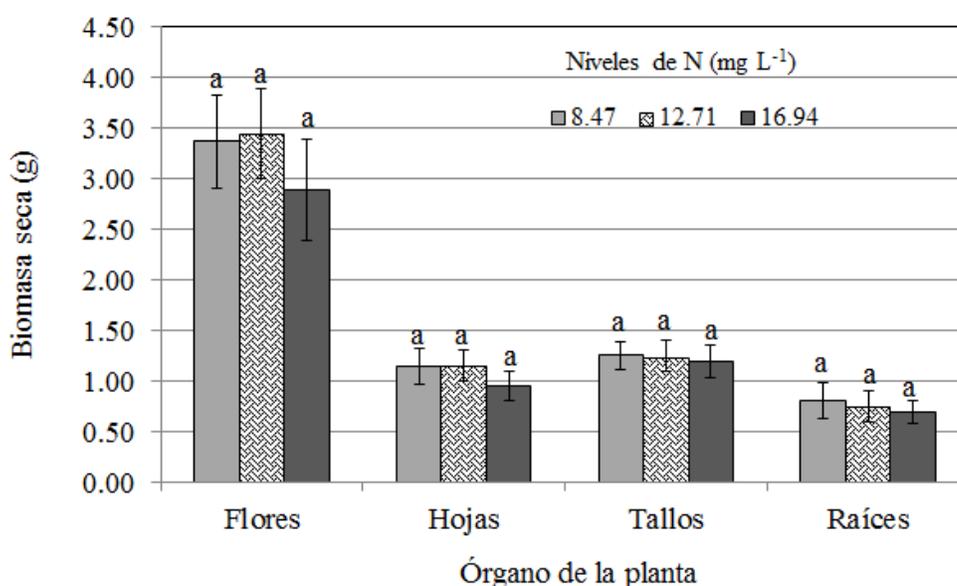


Figura 4.2 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con tres niveles de N en la solución nutritiva. Medias \pm desviación estándar, con la misma letra en cada órgano indican que no existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

En la nutrición de cultivos, generalmente la concentración de N guarda una relación positiva con la acumulación de biomasa seca en cierto intervalo hasta la concentración considerada como óptima, valores superiores ocasionan decremento en el peso de

biomasa seca; por ejemplo en lechuga al evaluar cuatro concentraciones de nitrógeno (0, 60, 120 y 180 kg ha⁻¹), la biomasa seca de hoja incrementó con el aumento en la dosis de N (Boroujerdnia y Alemzadeh, 2007). Para *Tagetes erecta* cv. Discovery Orange expuesta al fertilizante (9N-14P₂O₅-19K₂O-3MgO) en diferentes dosis (5, 10, 15, 20 y 25 g L⁻¹), Yahya (1996) concluyen que a 15 o 25 g L⁻¹ el peso seco en hojas se incrementa, pero en flores no hay efecto. En *Calendula officinalis*, Rahmaniet al. (2011) observan que dosis de N superiores a 90 kg ha⁻¹ aumentan la capacidad de producción de asimilados en los órganos reproductores, en consecuencia, la producción de flores se incrementa.

En este experimento la mayor biomasa seca se registró en flores (3.44 g), seguida de hojas (1.15 g) con el tratamiento de 12.71 mg L⁻¹. En tallos (1.29 g) y raíces (0.80 g) en el nivel de nitrógeno de 8.47 mg L⁻¹ (**Figura 4.2**). Con estos resultados se puede afirmar que para la obtención de mayor biomasa seca de flores y hojas se requieren dosis medias de N (12.6 mg L⁻¹), y para la obtención de altas biomásas de tallos y raíces es conveniente el empleo niveles bajos de nitrógeno o ausencia de este elemento.

4.3.2.2. Efecto principal del sombreado

La acumulación de biomasa seca tuvo el siguiente orden: flores>tallos>hojas>raíces, independientemente del porcentaje de sombreado evaluado (**Figura 4.3**).

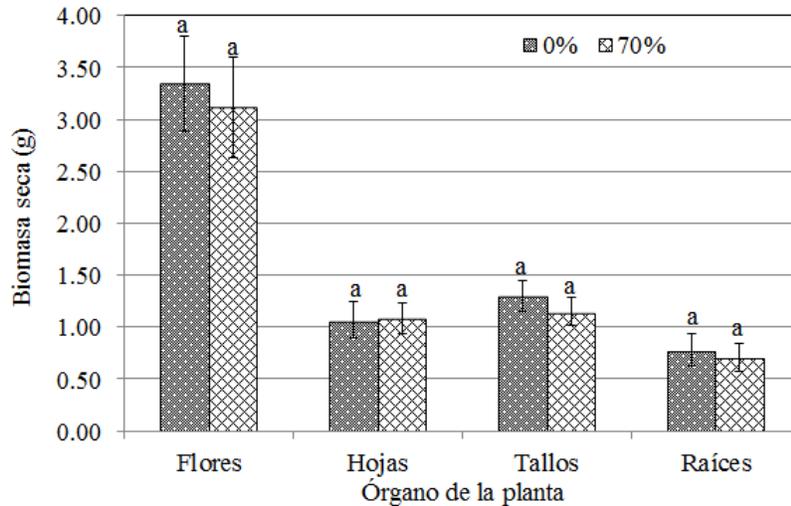


Figura 4.3 Biomasa seca de flores, hojas, tallos y raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con dos porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

Si bien no se tuvieron diferencias estadísticas significativas, se observa que el sombreado de 70 % produjo menores pesos de biomasa seca en los órganos evaluados que la ausencia de sombreado, excepto hojas; la biomasa de flores, tallos y raíces de este tratamiento fue inferior en 6.76, 11.89 9.69 %, respectivamente a la registrada en el tratamiento sin sombreado. Los resultados aquí obtenidos son similares a los reportados en el capítulo II de esta tesis, donde el 70% de sombreado redujo la biomasa seca en todos los órganos de estudio, esto pudiera deberse al efecto de una baja disponibilidad de la radiación visible siendo la disminución de la tasa fotosintética y el suministro de fotosintatos a la producción de biomasa (Hernández *et al.*, 2001). De la misma manera, Flores-López *et al.* (2008) en papa, evaluaron cuatro niveles de sombreado de (30, 50 y 60 % de sombra y un testigo sin malla), concluyeron que a menor radiación se reducía

eficiencia fotosintética de la planta, lo que repercute directamente en la reducción de biomasa seca del vástago y del tubérculo.

El sombreado de un invernadero, aunque permite atenuar los picos de temperaturas máximas, también puede ser casual de una disminución en la producción, debido a que el rendimiento potencial de un cultivo disminuye en proporción a la pérdida relativa de la luz debido al sombreado (Bouzo *et al.*, 2005). Caso contrario a este estudio Evangelista-Lozano *et al.* (2011) reportaron en un estudio con lígulas de *Tagetes erecta*, el peso seco fue menor en plantas sin malla comparadas con las plantas con malla, donde se atribuye que es debido al incremento de intensidad lumínica donde la planta reduce su desarrollo vegetativo.

Por otro lado, después de la iniciación floral, la ramificación rápida de *T. patula*, con su mejor posición para captar luz por el ángulo erecto de sus ramas (45-60 grados), se considera asociada a su creciente tasa absoluta de crecimiento en peso seco de hojas, tallo y total, aún después de los 76 días. La capacidad de ramificación de *T. patula* parece asociado con la prolongación del ciclo biológico (Serrato-Cruz, 2008).

Recapitulando, en esta variable se observó que el sombreado ocasionó una reducción en la biomasa seca de flores de (3.12 g), hojas (1.08 g), tallos (1.15 g) y raíces (0.71 g) en comparación con el testigo sin sombreado (**Figura 4.3**).

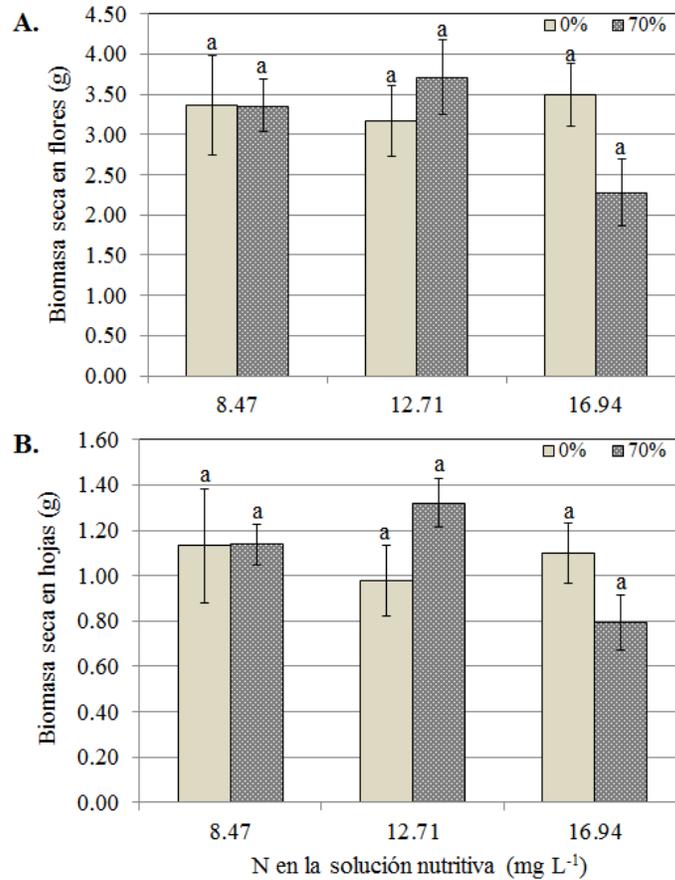


Figura 4.4 Biomasa seca de flores (A) y hojas (B) de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con tres niveles de N en la solución nutritiva y dos porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

4.3.2.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado)

Los pesos de la biomasa seca de flores (**Figura 4.4A**), hojas (**Figura 4.4 B**), tallo (**Figura 4.5A**) y raíces (**Figura 4.5B**), no fueron afectados significativamente por los tratamientos evaluados. Empero, se observan tendencias numéricas positivas de la concentración media evaluada de N en la solución nutritiva (12.71 mg L⁻¹), en flores y hojas de plantas con sombreado del 70 %. Estos resultados posiblemente se deben a la fase fenológica en la cual se aplicaron los tratamientos (floración), donde ya se encontraba formada la

estructura básica de la planta con niveles iguales en N en las plantas de todos los tratamientos durante la fase vegetativa. Esta condición probablemente mitigó los efectos de los diferentes niveles de nitrógeno y sombreado evaluados.

Adicionalmente, se debe tomar en cuenta que al ser el cempasúchil una planta C_3 , es considerada como poco eficiente en cuanto a la fijación de CO_2 , lo cual repercute en el crecimiento y en la producción de materia seca; además especies con este metabolismo se caracterizan por requerir altos niveles de agua y un ambiente húmedo para que expresen su potencial máximo (Ubaldo-Suárez, 2007).

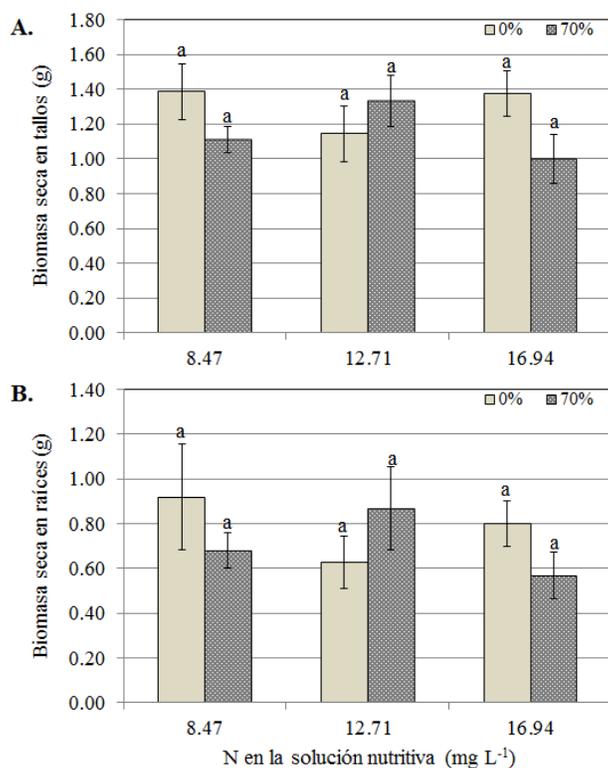


Figura 4.5 Biomasa seca de tallos (A) y raíces (B) de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) cv. Inca en fase de floración con tratamiento durante 40 días con tres niveles de N en la solución nutritiva y dos porcentajes de sombreado. Medias \pm desviación estándar, con letras distintas en cada órgano indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos.

4.3.3. Concentración nutrimental (N, P, K)

4.3.3.1. Efecto principal del factor nitrógeno

Concentración de nitrógeno. Las concentraciones evaluadas fueron mayores en hoja, seguidas de flores, raíces y tallos en todos los tratamientos. En los órganos analizados existieron diferencias estadísticas significativas en la concentración de N por efecto de la concentración de N en la solución nutritiva. Se observó una relación positiva entre la dosis de N suministrada y la concentración de este elemento en tejido vegetal. En hojas las concentraciones registradas con las dosis de N de 16.94 mg L⁻¹, fueron mayores a 34 g kg⁻¹ de materia seca (**Cuadro 4.11**).

Fósforo. El orden de concentración de P, independientemente del nivel de N adicionado a la solución nutritiva fue el siguiente: hojas > tallos > flores > raíces (**Cuadro 4.11**). La concentración de P en hojas, flores y raíces no fue influenciada significativamente por el factor nitrógeno en la solución nutritiva. En tallos, por el contrario, con las dos dosis más altas de N (12.71 y 16.94 mg L⁻¹) se incrementó la concentración de P, en comparación con la dosis baja evaluada de N (8.47 mg L⁻¹) (**Cuadro 4.11**).

Potasio. En las concentraciones foliares de K se observa un efecto negativo de dosis crecientes de N en la solución nutritiva. Por el contrario, en flores, tallos y raíces no existió efecto significativo del factor nitrógeno (**Cuadro 4.11**). La concentración de este elemento en flores tuvo una relación positiva al adicionar 16.94 mg L⁻¹ N en la solución nutritiva, pero no fue significativo entre tratamientos (**Cuadro 4.11**).

Numerosos trabajos reportan interacciones positivas entre el N y P, debido a que el N induce el incremento en la absorción de P y altos rendimientos (Adams, 1980). Los requerimientos de P para un crecimiento óptimo, dependiendo de la especie, están en un rango de 0.3 a 0.5 % del peso seco de la planta durante el desarrollo vegetativo

(Marschner, 2005). El K es el nutrimento que más se acumula en raíces y está distribuido en toda la planta y conformado aproximadamente el 10 % del peso seco de la planta (Gierth y Maser, 2007). Las concentraciones foliares de N, P y K en plantas de *T. erecta* de buena calidad fueron de alrededor de 4.20, 0.60 y 3.80 % respectivamente, las plantas deficientes de N se caracterizan por hojas amarillas y retraso en el crecimiento; con deficiencia de K tiene hojas en forma de copa hacia abajo con pecíolos cortos; hojas deficientes en P normalmente tienen una coloración roja en el margen de las hojas inferiores (Yahya, 1996). Mientras Mills y Benton (1996) reportan en *T. erecta* concentraciones adecuadas en hojas de N, P y K de 5.50, 0.67 y 2.19 %, respectivamente; en *T. patula* la concentración de esos elementos están en los intervalos de 3.32-3.62 % para N, de 0.49 a 0.54 % para P, y de 2.79-2.88 % para K. En esta investigación, el valor de concentración de N foliar con la dosis más alta de N (3.41 %) se ubicó en el límite inferior del intervalo óptimo reportado en *T. patula*. Las concentraciones foliares de P (0.35 a 0.43 %) y K (0.88 a 1.06 %) aquí determinadas, fueron inferiores a los que se reportan como óptimos en las investigaciones antes referidas.

Cuadro 4.11 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva durante la fase de floración.

Nutrimento	Nitrógeno en la solución nutritiva (mg L^{-1})	Órganos			
		Hojas	Flores	Tallos	Raíces
N	8.47	22.51±1.31 c	9.33 ±1.31b	4.53±0.41 b	5.60±0.46 b
	12.71	27.85±1.57 b	12.78±0.78a	5.91±0.37 a	7.78±0.57 a
	16.94	34.17±1.63 a	15.30±0.94a	6.23±0.32 a	6.68±0.46 ab
P	8.47	3.75±0.38 a	2.89±0.20 a	2.79±0.47 b	1.38±0.33 a
	12.71	4.30±0.39 a	2.92±0.37 a	3.83±0.24 a	1.27±0.40 a
	16.94	3.53±0.27 a	2.95±0.24 a	3.61±0.26 a	1.66±0.22 a
K	8.47	10.66±1.07 a	6.48±0.43 a	7.79±0.81 a	5.27±1.15 a
	12.71	8.95±0.62 ab	6.95±0.81 a	7.40±0.58 a	4.53±0.50 a
	16.94	8.80±0.66 b	7.27± 0.58a	7.28±0.73 a	4.01±0.86 a

Medias \pm DE con letras distintas en cada columna por nutrimento y por órgano, indican diferencias significativas (Tukey, $P \geq 0.05$) entre tratamientos.

4.3.3.2. Efecto principal del factor sombreado

Nitrógeno. El orden de concentración de N en los órganos de cempasúchil fue hojas > flores > raíces > tallos, independiente del porcentaje de sombreado (**Cuadro 4.12**). El factor nitrógeno no afectó la concentración de N en los órganos de cempasúchil.

Fósforo. El orden de concentración de P, independientemente del porcentaje de sombreado fue en el orden de: hojas > tallos > flores > raíces (**Cuadro 4.12**). La mayor concentración de este elemento se registró en el tratamiento con 70 % de sombreado en tallos. El resto de los órganos no tuvieron diferencias estadísticas significativas en la concentración de P por efecto del factor sombreado (**Cuadro 4.12**).

Potasio. Al igual que lo observado en las concentraciones de N, las concentraciones de K en los órganos de cempasúchil no mostraron diferencias estadísticas significativas en función del porcentaje de sombreado (**Cuadro 4.12**).

Cuadro 4.12 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes niveles de sombreado.

Nutrimento	Nivel de sombreado (%)	Órganos			
		Hojas	Flores	Tallos	Raíces
N	0	28.41±3.17 a	12.05±1.57a	5.72±0.52 a	6.53±0.64 a
	70	27.94±2.58 a	12.89±1.65a	5.40±0.52 a	6.85±0.70 a
P	0	3.92±0.23 a	2.97±0.30 a	3.12±0.46 b	1.27±0.23 a
	70	3.80±0.48 a	2.87±0.23 a	3.70±0.27 a	1.60±0.39 a
K	0	9.51±1.08 a	6.67±0.55 a	7.58±0.81 a	4.61±0.75 a
	70	9.42±0.69 a	7.13±0.69 a	7.40±0.58 a	4.60±1.02 a

Medias \pm DE con letras distintas en cada columna por nutrimento por órgano, indican diferencias significativas (Tukey, $P \geq 0.05$) entre tratamientos

4.3.3.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado)

Nitrógeno. El orden de concentración de N en los órganos analizados fue: hojas > flores > tallos > raíces, independiente del tratamiento (**Cuadro 4.13**). En hojas, la mayor dosis de N evaluada (16.94 mg L^{-1}) con ambos niveles de sombreado y la dosis media de N (12.71 mg L^{-1}) en ausencia de sombreado mostraron concentraciones significativamente mayores de N al resto de los tratamientos. En el resto de los órganos, fue evidente la dominancia del efecto del factor nitrógeno, dado que en las dos concentraciones más altas de éste en la solución nutritiva, de manera independiente al nivel de sombreado, se tienen las concentraciones de N superiores (**Cuadro 4.13**).

Fósforo. No existió un orden de concentración de P coincidente en todos los tratamientos; sin embargo, en la mayoría de ellos hubo coincidencia en que las concentraciones superiores se presentaron en láminas foliares por el contrario, las más bajas en raíces (**Cuadro 4.13**). Las concentraciones de P sólo fueron diferentes estadísticamente entre tratamientos en los tallos; solo el tratamiento de N de 8.47 mg L^{-1} sin sombreado tuvo un valor significativamente menor al resto de los tratamientos.

Potasio. La concentración de K fue estadísticamente distinta entre tratamientos solo en hojas; donde se aprecia de manera general una tendencia de reducción en ésta en plantas sin sombreado y tratadas con las dos concentraciones superiores de N (**Cuadro 4.13**).

La concentración de nutrimentos varía no sólo entre las diferentes especies, sino también, en los distintos órganos de una misma planta. Esta variación está afectada por la edad fisiológica de la planta, la posición del tejido en la planta, la disponibilidad y concentración de minerales en el substrato y las condiciones del suelo (Medina *et al.*, 1999). Según Evans y Poorter (2001) al determinar la tasa fotosintética, el área foliar específica y la

partición de nitrógeno en hojas de diez especies de dicotiledóneas C₃ cultivadas en irradiancias de fotones de 200 y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, concluyen que la concentración total de nitrógeno fue ligeramente superior en plantas cultivadas en condiciones de poca luz, así como la concentración de nitrato, de tal manera que la concentración de nitrógeno por unidad de masa fue independiente de la irradiación.

Pal y Ghosh (2010) evaluando diferentes niveles de potasio (0, 50, 100 y 200 kg ha^{-1}) registran un incremento gradual en las concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio en hojas de *T. erecta* cv. Siracole, donde el contenido de N es de 3.08 % en el tratamiento testigo y de 3.22 % en el tratamiento de 50 kg ha^{-1} . La concentración de P resulta muy variable, oscilando de 0.22-0.31 %, y la concentración de K de 0.20 % con los tratamientos aplicados de K en el intervalo de 50 a 100 kg ha^{-1} .

Cuadro 4.13 Concentración de N, P y K (g kg^{-1} de materia seca) en hojas, flores, tallos y raíces en cempasúchil var. Inca en respuesta a diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva y porcentajes de sombreado durante la fase de floración.

Nutrimento	Nitrógeno en la solución nutritiva		Órganos			
	(mg L^{-1})	Sombreado (%)	Hojas	Flores	Tallos	Raíces
N	8.47	0	21.32±0.88 d	8.82±0.60 c	4.60±0.32 b	5.35±0.48 b
	8.47	70	23.70±1.52 dc	9.85±1.86 bc	4.47±0.53 b	5.85±0.47 b
	12.71	0	28.60±0.82 abc	12.62±0.99 abc	6.07±0.39 ab	7.37±0.38 ab
	12.71	70	27.10±2.16 bcd	12.95±0.64 abc	5.75±0.39 ab	8.20±0.71 a
	16.94	0	35.32±1.65 a	14.72±1.34 ab	6.50±0.27 a	6.87±0.61 ab
	16.94	70	33.02±1.60 ab	15.87±0.25 a	5.97±0.35 ab	6.50±0.32 ab
P	8.47	0	4.07±0.25 a	2.82±0.22 a	2.17±0.42 b	0.95±0.24 a
	8.47	70	3.42±0.46 a	2.95±0.21 a	3.41±0.26 ab	1.82±0.26 a
	12.71	0	4.10±0.29 a	3.26±0.40 a	3.71±0.26 a	1.35±0.26 a
	12.71	70	4.50±0.49 a	2.57±0.27 a	3.95±0.24 a	1.20±0.55 a
	16.94	0	3.60±0.07 a	2.82±0.29 a	3.49±0.25 ab	1.52±0.05 a
	16.94	70	3.47±0.40 a	3.07±0.19 a	3.73±0.29 a	1.80±0.31 a
K	8.47	0	11.97±0.80 a	5.85±0.32 a	7.69±1.12 a	4.07±1.09 a
	8.47	70	9.35±0.94 ab	7.11±0.24 a	7.89±0.53 a	6.47±0.95 a
	12.71	0	8.27±0.27 b	6.26±0.29 a	7.49±0.81 a	4.82±0.58 a
	12.71	70	9.62±0.71 ab	7.64±1.07 a	7.30±0.35 a	4.25±0.43 a
	16.94	0	8.30±0.71 b	7.89±0.39 a	7.55±0.69 a	4.95±0.61 a
	16.94	70	9.30±0.59 ab	6.64±0.62 a	7.02±0.85 a	3.07±0.87 a

Medias \pm DE con letras distintas en cada columna por nutrimento, indican diferencias significativas (Tukey, $P \geq 0.05$) entre tratamientos.

4.3.4. Carotenoides totales en flores

4.3.4.1. Efecto principal del factor nitrógeno

La relación entre la concentración de pigmentos y la disponibilidad de nutrientes se han investigado en varios estudios, indicando que en algunas especies como el alga roja *Gracilaria* son capaces de asimilar N y cuando éste se encuentra en exceso, se almacena en proteínas o pigmentos (Ramlov *et al.*, 2011). En el presente estudio las plantas tratadas con el nivel más bajo de N tuvieron una concentración de carotenoides inferior que representa el 45.94 % de la concentración registrada en el tratamiento con el nivel más alto de N (16.94 mg L⁻¹), mostrando diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (**Figura 4.6A**), lo cual confirma los resultados de investigaciones anteriores. Kopsell *et al.* (2007) en un estudio realizado en tres variedades de col tratadas con N a concentraciones de 6, 13, 26, 52 y 105 mg L⁻¹, observan que con el aumento en la dosis de N en las tres variedades en estudio se incrementa la luteína y β-caroteno. Así mismo, Chenard *et al.* (2005) en perejil mencionan que al incrementar la dosis nitrogenada a 105 mg L⁻¹ hay mayores concentraciones de luteína, zeaxantina y β-caroteno. En lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), también se observan incrementos en carotenoides en flores cuando se aplican dosis altas de N (200 kg ha⁻¹) (Biesiada *et al.*, 2008). Existen también reportes donde la concentración de N no se asocia con la de carotenoides; ejemplo de ello es un estudio en zanahoria (*Daucus carota* L.) donde se usaron diferentes fuentes nitrogenadas, dosis, fechas de aplicación y nutrición foliar divididos en dos experimentos; en ambos casos cada ensayo, subdivididos en bloque A (sin nutrición foliar) y bloque B (con nutrición foliar), concluyen que en ningún experimento se presenta un efecto significativo por la fertilización nitrogenada en la concentración de carotenoides en zanahoria (Smolen y Sady, 2009).

4.3.4.2. Efecto principal del factor sombreado

Los carotenoides presentan dos funciones en plantas; una es la de ser los responsables de la pigmentación de la planta; la segunda, son disipadores del exceso de energía luminosa a

través del ciclo de la zeaxantina (Hirschberg, 2001). En el presente estudio, las plantas cultivadas bajo sombra tuvieron mayor concentración de carotenoides, superando en un 54.30 % al tratamiento testigo (sin sombreado) (**Figura 4.6B**). Estos resultados coinciden con los reportados por Dymova y Goloko, (2007) en bígula o consuelda media (*Ajuga reptans*) donde se registra una disminución de pigmentos en plantas expuestas a plena luz del sol en comparación con plantas cultivadas en sombra, por ello, concluyen que la luz afecta la biosíntesis de pigmentos de manera negativa. En lígulas de *T. erecta* Evangelista-Lozano *et al.* (2011) consignan que plantas cultivadas en dos ambientes diferentes en radiación fotosintéticamente activa (con malla al 50 % y sin malla) tenían respuestas diferenciales, evidenciando experimentalmente que lígulas de plantas bajo malla tienen un incremento en el contenido de xantofilas. Tales resultados también son coincidentes con los presentados en el capítulo II de esta tesis, donde en el sombreado de 70 % se registró un incremento en la concentración de carotenoides.

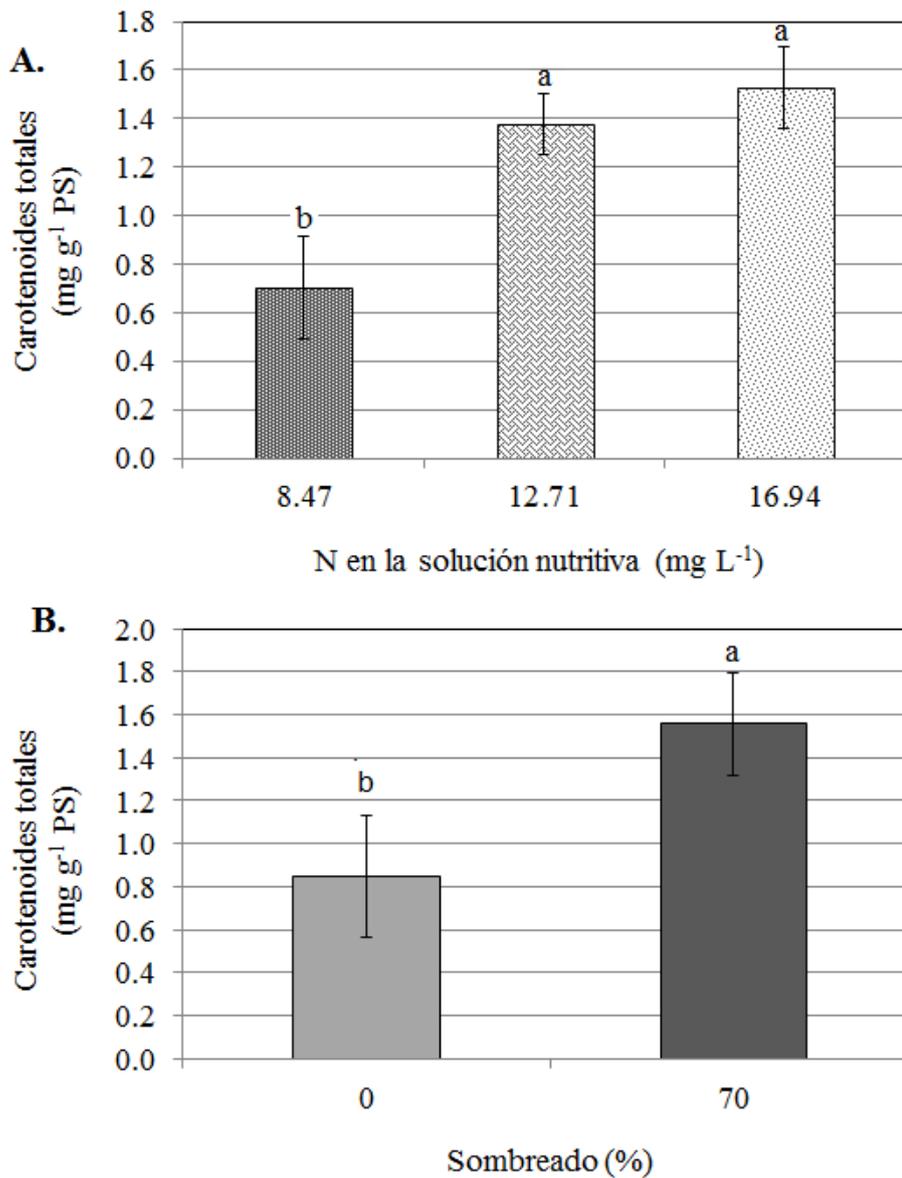


Figura 4.6 Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva (A) y dos porcentajes de sombreado (B) en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.

4.3.4.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado)

La concentración de carotenoides registrada en el tratamiento con la dosis nitrogenada baja (8.47 mg L^{-1}) sin sombreado fue significativamente menor al resto de los tratamientos (**Figura 4.7**). Ramlov *et al.* (2011) mencionan que la interacción de estos dos factores afecta la concentración de pigmentos; los aumentos o disminuciones de estas concentraciones están relacionadas con la capacidad fotosintética de la especie. Estos autores también evaluaron dos concentraciones de nitrato 125 y $250 \text{ } \mu\text{mol}$ y dos densidades de flujo de fotones, baja ($50 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y alta ($100 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), en la macroalga *Gracilaria domingensis*, destacando que altas concentraciones de luteína, zeaxantina y criptoxantina se asocian con bajas irradiancias, siendo variable la respuesta a la concentración nitrogenada; por otra parte, se registra mayor concentración de trans- β -caroteno con baja concentración nitrogenada con un alto flujo de fotones.

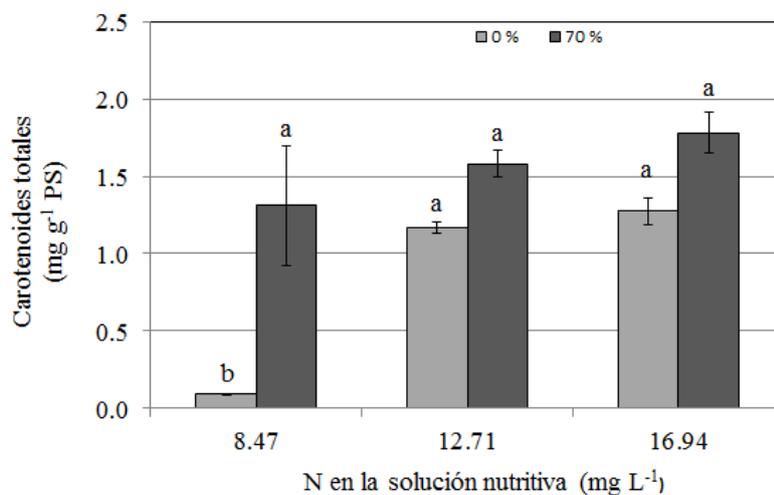


Figura 4.7 Carotenoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas durante 38 días con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva (A) y dos porcentajes de sombreado (B) en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.

4.3.5. Flavonoides totales en flores

4.3.5.1. Efecto principal del factor nitrógeno

En esta parte del estudio, se evidenciaron efectos negativos de concentraciones crecientes de nitrógeno en la solución nutritiva en la concentración de flavonoides totales en flor. Por tanto, la mayor concentración de estos metabolitos se obtuvo al adicionar la dosis baja de N (8.47 mg L^{-1}); mientras que con el tratamiento de dosis alta de N (16.94 mg L^{-1}), se obtuvo la menor concentración de flavonoides, representando el 88.93 % de la concentración superior (**Figura 4.8A**). Contrario a los resultados antes referidos, Król (2011) reporta que las flores de plantas de caléndula (*Calendula officinalis*) sometidas a dosis más altas de nitrógeno (120 y 160 kg ha^{-1}) desarrollan contenidos inferiores de compuestos fenólicos.

4.3.5.2. Efecto principal del factor sombreado

Las plantas cultivadas bajo sombra de 70 % tuvieron una concentración superior de flavonoides, entre 12 y 36 % que la registrada en plantas sin sombreado (**Figura 4.8B**). Warren *et al.* (2003) mencionan que al incrementar la luz, aumenta la intensidad de fotosintatos primarios, lo que conduce a un incremento en la concentración fenólica de la planta. Con este antecedente y los resultados obtenidos, es evidente que existe contrariedad entre los resultados de diversas investigaciones. Karimi *et al.* (2013) al evaluar el efecto de dos intensidades luminosas en la acumulación y concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas, tallos y raíces de tres variedades de *Labisia pumila*, concluyen, que a mayor intensidad luminosa incrementan los flavonoides totales.

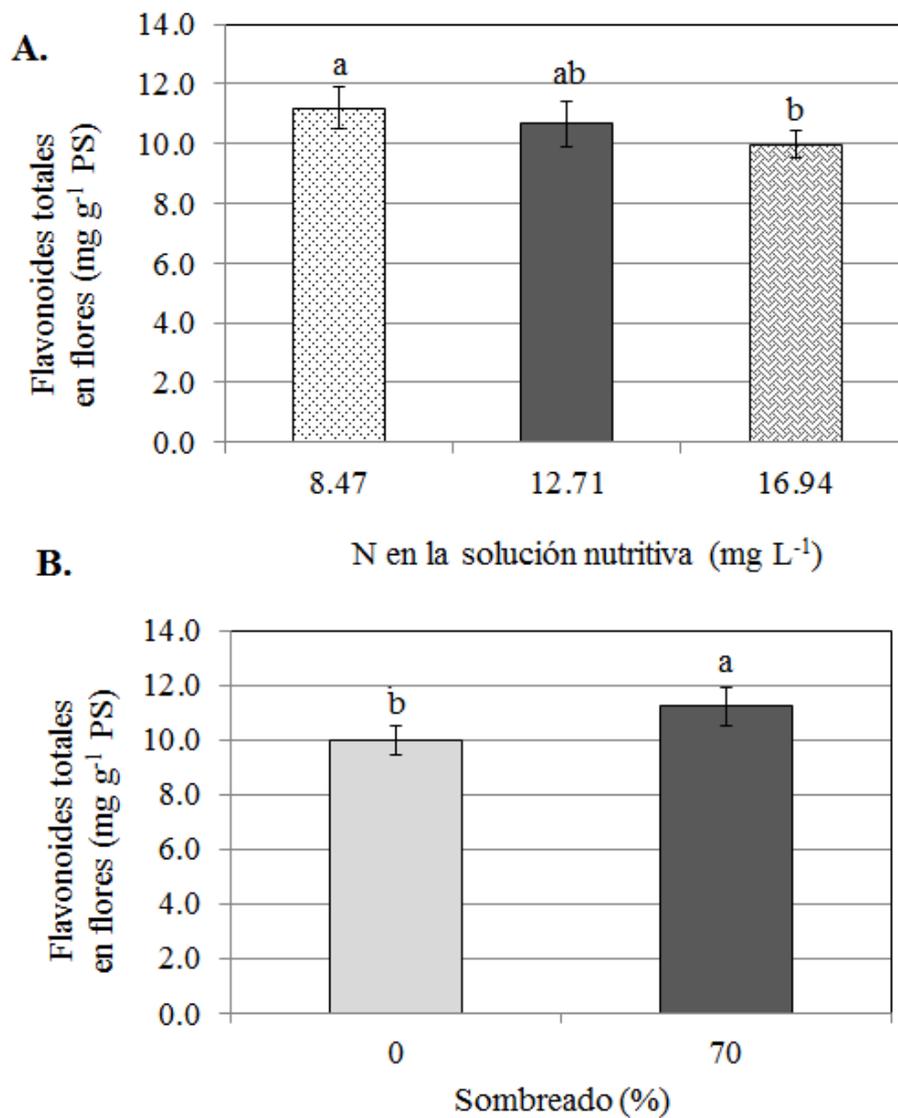


Figura 4.8 Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 38 días con diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva (A) y dos porcentajes de sombreado (B) en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS= peso seco.

4.3.5.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno x sombreado)

En este estudio no existieron efectos significativos de la interacción de los factores de estudio en la concentración de flavonoides totales en lígulas de las cabezuelas (**Figura 4.9**).

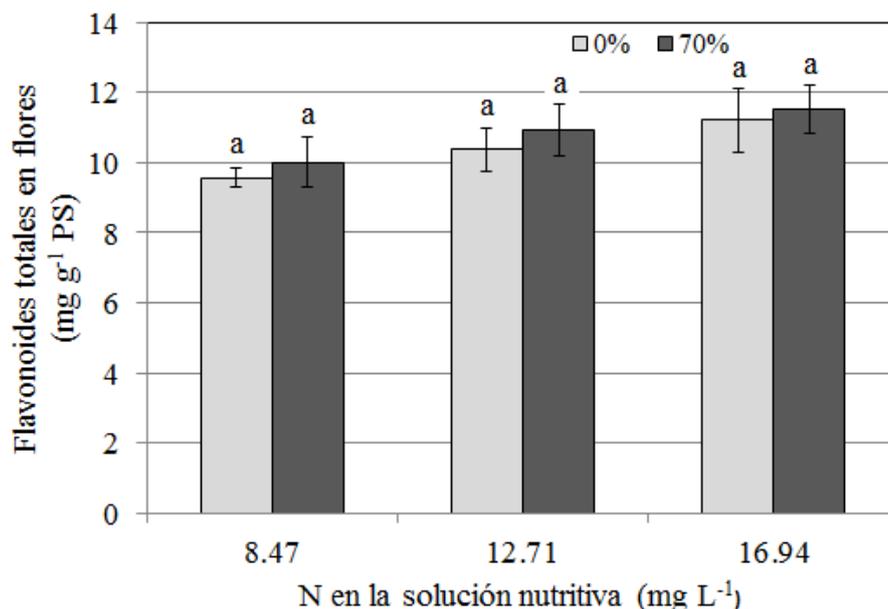


Figura 4.9 Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 38 días con diferentes niveles de nitr3geno en la soluci3n nutritiva en interacci3n con dos porcentajes de sombreado en fase de floraci3n. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PS=peso seco.

4.3.6. Aceites esenciales por 3rganos

Los tiempos de retenci3n de los compuestos de aceites esenciales identificados en hojas, flores, tallos y raíces se presentan en el **Cuadro 4.14**. La técnica GS/MS permiti3 identificar 17 compuestos diferentes en los distintos 3rganos de la planta de *T. erecta* var. Inca (**Cuadro 4.14**). El contenido y cantidad de compuestos de aceites esenciales son afectados por factores como el hábitat de la planta (Karouso *et al.*, 2005), la etapa fenol3gica, las diferentes partes de las que se extrae, la composici3n del suelo y la fertilizaci3n mineral (Macías y Galindo, 2001), por lo que es común encontrar diferencias aún entre plantas de la misma especie. En algunas especies mexicanas de este género como *T. erecta* (Sefidkon *et al.*, 2004; Ogunwande y Olawore, 2006), *T. filifolia* (Serrato *et al.*, 2008),

T. lucida (Ciccío, 2004) y *T. patula* (Sagar *et al.*, 2005), se han identificado metabolitos secundarios pero aún se desconoce la composición de la mayoría de las especies.

No obstante que hay variaciones en sus concentraciones relativas, los principales aceites constituyentes de *T. minuta*, *T. erecta* y *T. patula* son monoterpenos (Krishna *et al.*, 2002).

En *T. minuta* identificaron limoneno, mirceno y espatulenol (Gil *et al.*, 2000), compuestos que coinciden con los reportados en esta parte del presente estudio; del mismo modo en *T. argentina* el limoneno ha sido reportado (Vázquez *et al.*, 2011). De los compuestos identificados en el aceite de la especie *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, comúnmente llamada canilla de venado, planta medicinal usada con efecto antiinflamatorio y antimicótico, cuatro componentes coincidieron con nuestro estudio: cariofileno, γ -elemeno, óxido de cariofileno y espatulenol (Manzano-Santana *et al.*, 2011).

Cuadro 4.14 Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración.

Compuesto	Tiempo de retención, min	Compuesto	Tiempo de retención, min
D-limoneno	12.15	Espatulenol	23.25
Ocimeno	12.59	Terpinoleno	13.4
Cariofileno	19.36	Piperitona	16.47
Sabineno	10.94	γ -Elemeno	21.27
Careno	13.34	Verbenol	24.32
β -felandreno	10.94	Óxido de cariofileno	23.17
β -Mirceno	11.36	Tiantreno	26.21
α -Pinoeno	9.93	β -Farneseno	19.96
Trans-pinoeno	26.96		

4.3.6.1. Componentes del aceite esencial en hojas

En hojas se identificaron cuatro componentes presentes en todos los tratamientos; los cuales son: D-limoneno, ocimeno, β -mirceno y α -pineno. Los componentes que se presentaron en mayor área fueron ocimeno y D-limonero, particularmente fueron mayores en los dos tratamientos con la dosis baja de N. Así también en el tratamiento de dosis más baja de N en la solución nutritiva se observó inhibición en la síntesis de cariofileno en hojas. Destaca también en hojas, el alto porcentaje de β -mirceno, α -pineno y piperitona en el tratamiento consistente en la dosis más baja de N sin sombreado. En hojas de ajedrea de jardín (*Satureja hortensis*), el α -pineno fue identificado en mayor proporción con el incremento en la dosis de N (0, 50, 100 y 150 kg ha⁻¹) (Mumivand *et al.*, 2011).

El compuesto γ -elemeno solo fue identificado en el tratamiento con 70 % de sombreado y dosis alta de N; así también el sabineno, solo se identificó en el tratamiento sin sombreado y con la dosis baja de N (**Cuadro 4.15**).

Cuadro 4.15 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en hojas de plantas de *Tagetes erecta* var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la floración.

N (mg L ⁻¹)	8.47		12.71		16.94		
	Sombreado (%)	0	70	0	70	0	70
D-Limoneno		24.13	16.53	11.7	12.46	9.74	3.71
Ocimeno		36.78	16.07	8.64	18.04	15.8	5.64
Cariofileno		---	---	1.31	1.49	1.18	1.96
Sabineno		7.08	---	---	---	---	---
Careno		---	2.99	2.79	2.76	2.56	---
β - Felandreno		---	---	2.16	2.18	2.27	0.96
β - Mirceno		2.50	1.10	1.23	1.16	1.09	0.36
α -Pineno		2.54	1.42	1.13	1.11	0.89	0.32
<i>Trans</i> -Pineno		---	---	---	---	---	24.8
Terpinoleno		5.27	---	---	---	---	---
Piperitona		23.6	8.14	---	7.62	8.52	---
γ -Elemeno		---	---	---	---	---	0.22

Contrario a lo aquí observado, en albaica (*Ocimum basilicum* L.) se registró la presencia de limoneno con dosis altas de N (300 kg ha⁻¹), obteniéndose porcentajes de éste de 13.2 % en la variedad Mostruoso mammoth, 17.3 % en Genovese profumatissimo y en Napoletano a foglia di lattuga del 16.8 % (Sifola y Barbiere, 2006).

En hojas, se observa que el contenido de α -pineno se reduce con el sombreado, independientemente del nivel de nitrógeno. En la planta conocida como bolita prieta (*Varronia curassavica* Jacq) bajo diferentes intensidades luminosas (20, 50, 70 y 100 %) se han identificado α -pineno, compuesto que presentó el mayor porcentaje en los sombreados intermedios de 50 y 70 %, mientras que con sombreados de 20 y 100 % disminuyó; lo anterior demuestra que la síntesis de este componente está influenciada por la irradiación. La síntesis de estos metabolitos en algunas plantas puede ser afectada por la irradiación, otro ejemplo, sería la biosíntesis de isopreno, su constituyente básico (Feijó *et al.*, 2014).

4.3.6.2. Componentes del aceite esencial en cabezuelas

El cariofileno es el componente encontrado en todos los tratamientos evaluados, independiente del nivel de nitrógeno y del sombreado; en todos los casos presenta valores por debajo de 1 %. El cariofileno se ha identificado en otras especies como en el aceite de clavo, compuesto importante porque actúa como supresor de malezas; la luz tiene un efecto positivo en este compuesto debido que al incrementar la intensidad luminosa aumenta su síntesis (Stoklosa *et al.*, 2012). El trans-pineno fue el compuesto más abundante en las cabezuelas con el nivel medio de nitrógeno y sin sombreado (16.3 %) (**Cuadro 4.16**). En *T. minuta*, se reporta que el principal compuesto en flores es el β -ocimeno con (45.4 %) (Chamorro *et al.*, 2008). Destacó la presencia de verbenol en las cabezuelas, sólo en el tratamiento de dosis alta de N y sombreado.

Cuadro 4.16 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en flores de plantas de *Tagetes erecta* var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración.

N (mg L⁻¹)	8.47		12.71		16.94	
Sombreado (%)	0	70	0	70	0	70
D-Limoneno	---	---	---	0.30	0.29	---
Ocimeno	---	---	---	0.49	0.53	---
Cariofileno	0.54	0.44	0.62	0.47	0.66	0.44
<i>Trans</i> -Pineno	---	---	16.3		3.77	---
Espatulenol	2.73	---	---	2.17	---	---
Piperitona	---	---	1.13	---	---	1.07
Verbenol	---	---	---	---	---	0.69

4.3.6.3. Componentes del aceite esencial en tallos

En el aceite proveniente de tallos, solo se identificaron tres componentes. Se observó el efecto positivo del nitrógeno en las dosis media y alta evaluadas en la síntesis de β -farneseno. Así también, el β -farneseno y el cariofileno no se identificaron con las dosis bajas de N (**Cuadro 4.17**).

Cuadro 4.17 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en tallos de plantas de *Tagetes erecta* var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración.

N (mg L⁻¹)	8.47		12.71		16.94	
Sombreado (%)	0	70	0	70	0	70
Cariofileno	---	---	---	2.54	2.28	---
Piperitona	6.3	---	---	---	6.08	5.51
β -farneseno	---	---	1.48	3.26	2.85	2.64

4.3.6.4. Componentes del aceite esencial en raíces

El aceite esencial que se registró en las raíces en mayor proporción en todos los tratamientos de estudio es el β -farneseno; particularmente se observa mayor área bajo la curva de este componente con los niveles medio y alto de N evaluados y con sombreado del 70 % (**Cuadro 4.18**).

Cabe mencionar que en este estudio, tanto en tallos como en hojas se identificaron los mismos componentes de aceites esenciales en este estudio, donde el β -farneseno se ha identificado como uno de los compuestos biológicamente activo en manzanilla (Raal *et al.*, 2003). También se ha señalado que en *Guarea guidonia*, una especie de importancia medicinal, contiene fenestreno como componente mayoritario con diferentes estructuras químicas: (Z)- β -farneseno (29.1 %) y (E)- β -farneseno (10.3 %) (Hernández-Bastidas *et al.*, 2014).

Cuadro 4.18 Área bajo la curva (%) de los componentes químicos del aceite esencial, presentes en raíces de plantas de *Tagetes erecta* var. Inca, tratadas con tres niveles de nitrógeno y dos porcentajes de sombreado durante la fase de floración.

N (mg L ⁻¹)	8.47		12.71		16.94	
Sombreado (%)	0	70	0	70	0	70
Cariofileno	---	---	---	1.03	---	---
Piperitona	3.61	4.84	---	---	---	---
β - farneseno	5.38	4.71	8.22	14.22	10.97	18.69
Óxido de cariofileno	---	---	3.28			
Tiantreno	---	---	---	---	7.85	---

4.3.7. Concentración de clorofilas

4.3.7.1. Efecto principal del factor nitrógeno

En función de la concentración de N adicionada a la solución nutritiva, sólo existieron diferencias estadísticas en la concentración foliar de clorofila b; observándose la media más alta con la dosis de N media evaluada, sin que este resultado difiera con la dosis baja. Es

importante notar que la menor concentración de clorofila b se tuvo en plantas tratadas con la dosis alta de N (**Figura 4.10**). Contrario a lo anterior, Polityca y Golcz, 2004 al evaluar en albaca, durante dos cosechas (inicio y plena floración), el efecto de diferentes dosis de N (0, 1.35, 1.80 g por planta) en la concentración de clorofilas a y b, reportan que la fertilización nitrogenada tuvo un efecto significativo en el incremento de ambas clorofilas. Así también, Porto *et al.* (2013) al evaluar cuatro dosis de N (0, 40, 80 y 120 kg ha⁻¹) en maní forrajero (*Arachis pinto*), mencionan que las concentraciones de clorofilas a, b y total son más altas al adicionar 120 kg ha⁻¹ de N.

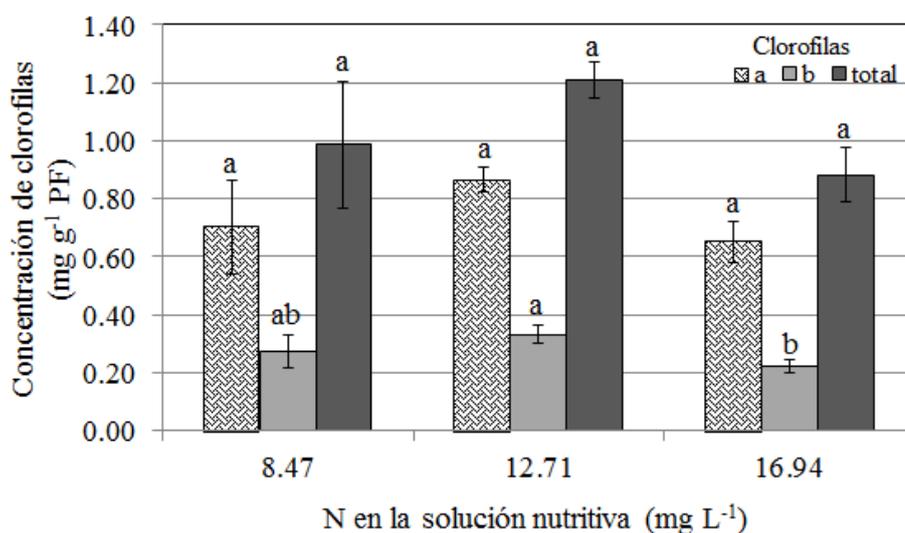


Figura 4.10 Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de campesúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.7.2. Efecto principal del factor sombreado

No existieron diferencias estadísticas en las concentraciones de clorofilas por efecto del sombreado (**Figura 4.11**). De manera típica, la reducción en la intensidad luminosa se asocia con aumento en la concentración de pigmentos fotosintéticos; tal es el caso de Elorza-Martínez *et al.* (2007) quienes al cultivar plantas de vainilla con tutores naturales en casa sombra con 70 % de reducción de luz, y plantas sin sombreado con tutores naturales,

muestran que en el cultivo con malla sombra incrementó la concentración foliar de clorofila. De manera similar, Casierra-Posada *et al.* (2012) en caléndula (*Calendula officinalis* L.) encuentran que al cultivar estas plantas en plena exposición y bajo una malla polisombra del 37 % de reducción de luz, la relación de clorofilas a/b fue mayor en hojas cultivadas bajo sombra, en comparación con las hojas cultivadas en plena exposición.

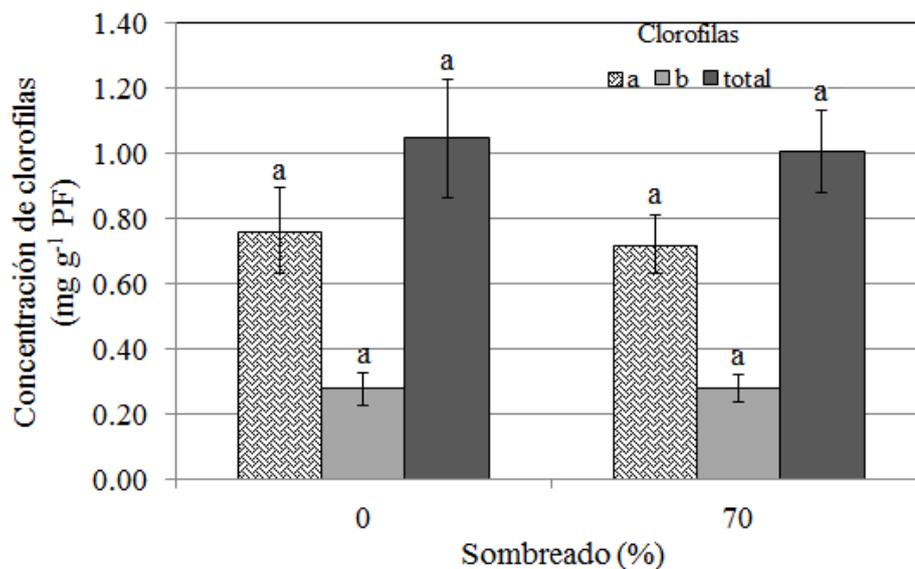


Figura 4.11 Concentraciones foliares de clorofilas de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.7.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno x sombreado)

La concentración de clorofilas a y b no fue influenciada por la interacción de los factores de estudio (**Figura 4.12**). De la misma manera, la concentración de clorofilas totales no fue estadísticamente diferente entre tratamientos (**Figura 4.13**).

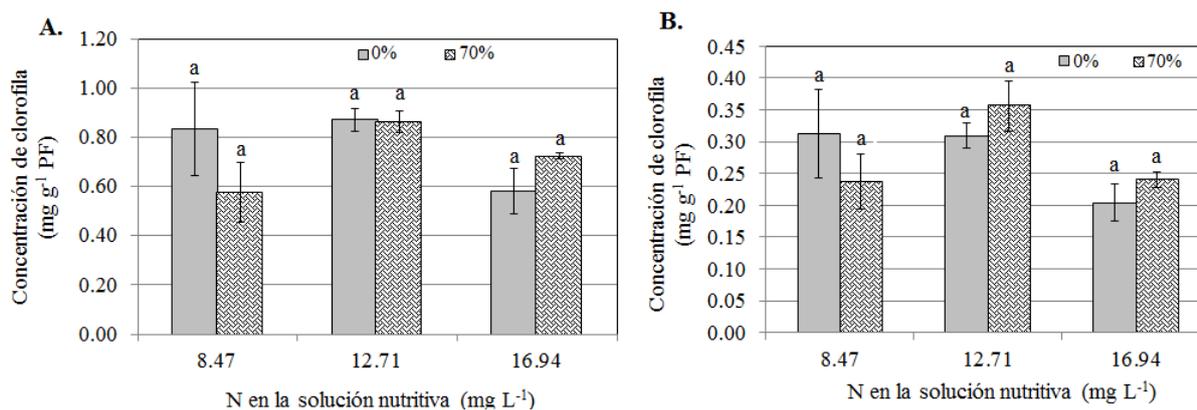


Figura 4.12 Concentración foliar de clorofila a (A) y clorofila b (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

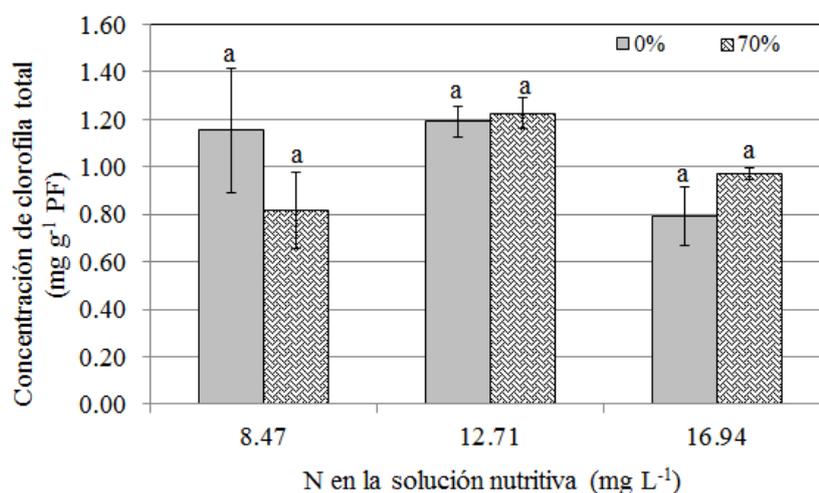


Figura 4.13 Concentración foliar de clorofila total de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.8. Azúcares totales en hojas y flores

4.3.8.1. Efecto principal del factor nitrógeno

En la **Figura 4.14** se presentan las concentraciones de azúcares totales en hojas y flores de plantas de cempasúchil tratadas con diferentes niveles de nitrógeno. En hojas (**Figura 4.14A**) y flores (**Figura 4.14B**) se observó que no existió efecto de nitrógeno en la

concentración de azúcares; sin embargo, en hojas se observa una relación negativa entre dosis de N y azúcares. De manera similar, Baranauskiene *et al.* (2003) en tomillo (*Thymus vulgaris*), al evaluar cuatro concentraciones de N (0, 45, 90 y 135 kg ha⁻¹) realizaron dos cosechas durante su producción, y determinaron la concentración de azúcares totales y sacarosa, observando que éstas incrementaron con la dosis bajas de N en la segunda cosecha. Así también Mohd y Jaafar (2011) en *Labisia pumila* reportan que los carbohidratos totales no estructurales fueron influenciados por los niveles de nitrógeno aplicados, éstos disminuyeron al incrementar la fertilización de N, siendo el valor más bajo en 270 kg N ha⁻¹ en un 27 %. Del Pozo *et al.* (2002), reportaron en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) que el contenido de carbohidratos solubles estructurales está determinado por factores metabólicos relacionados con la fotosíntesis, respiración y distribución de nutrimentos que pueda generar cada planta y puede modificarse con el nivel de nitrógeno en la planta y su estado fisiológico, siempre que las condiciones climáticas no sean una limitación.

Chaín *et al.* (2002) indican que los azúcares estructurales y no estructurales son almacenados en tallos, hojas y pétalos, mismos que proveen la energía necesaria para que la flor complete su desarrollo. Mientras, Huber (1994) menciona que hay un movimiento de azúcar a la planta provocado por la transpiración, lo cual lleva a una acumulación de azúcares en tallos y hojas, para posteriormente ser trasladado a los pétalos vía floema. Por tanto, los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía, necesaria para la inflorescencia en procesos fisiológicos y bioquímicos.

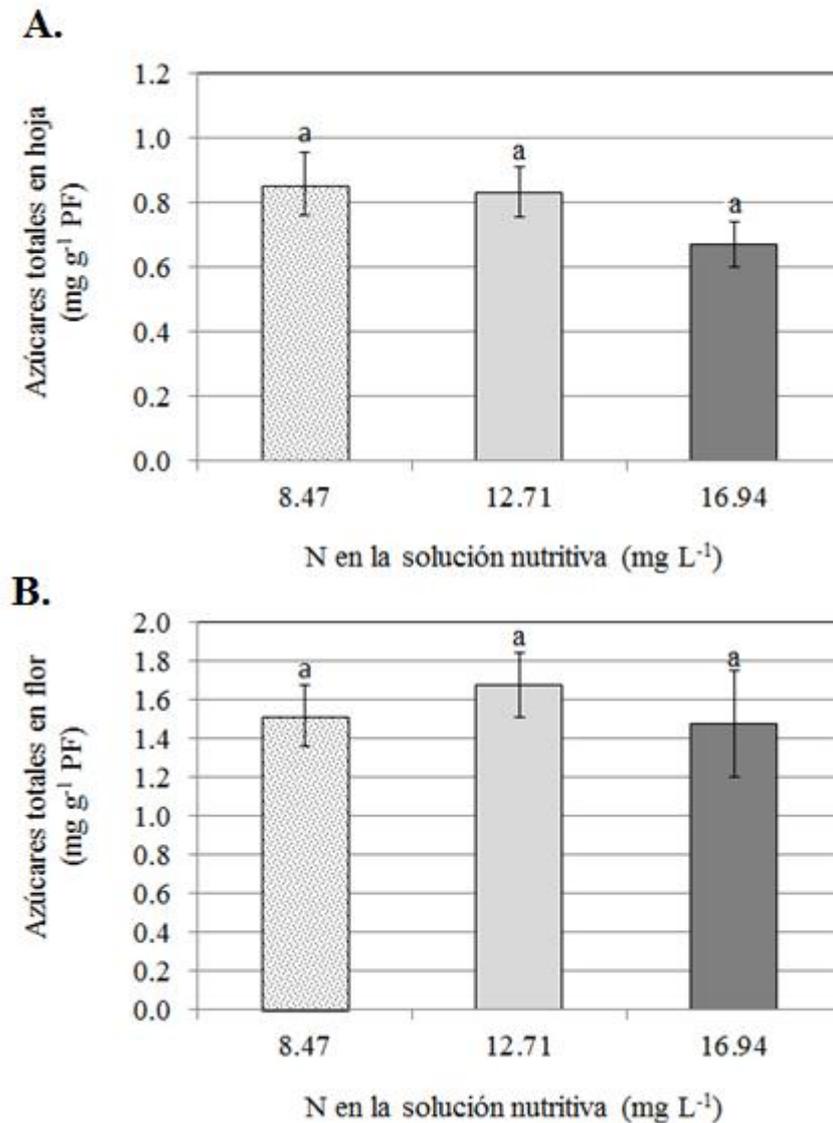


Figura 4.14 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.8.2. Efecto principal del factor sombreado

Tanto en hojas como en cabezuelas (**Figura 4.15Ay 4.15B**) no existió efecto significativo del factor sombreado. Páez *et al.* (2000) mencionan que la concentración de carbohidratos solubles se reduce en un 18 % en hojas de verdolaga en la radiación más baja (30 % de

radiación total); es decir con mayor sombreado, comparadas con las plantas que crecieron bajo luz total (100 %).

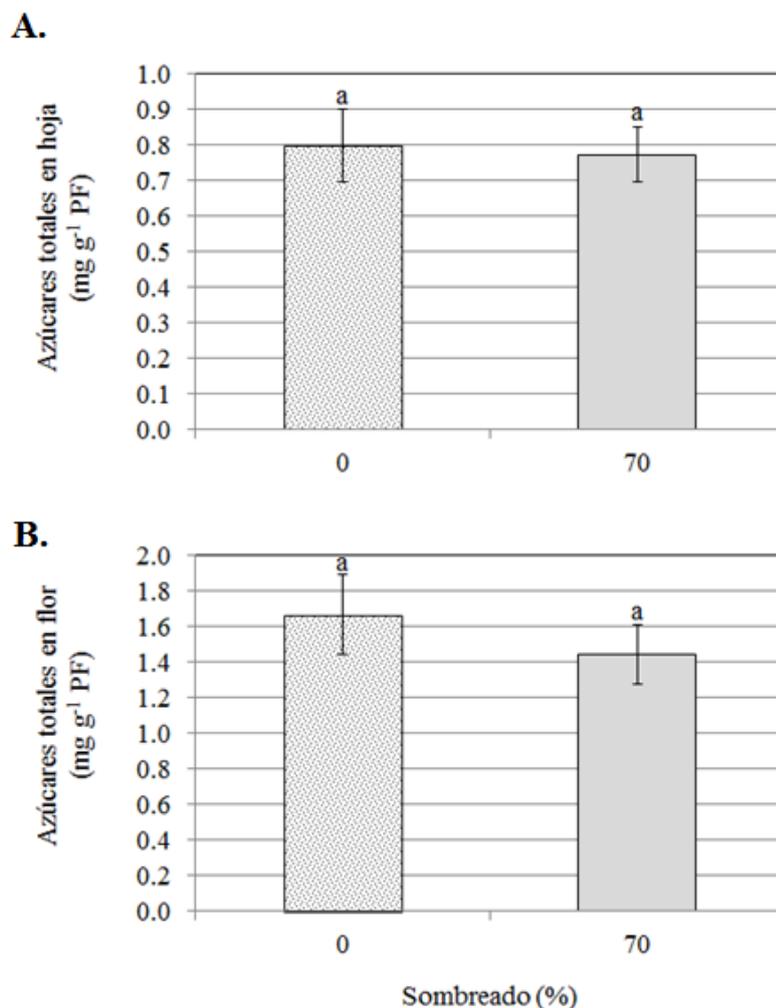


Figura 4.15 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.8.3. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado)

En hojas como en flores los tratamientos consistentes en diferentes concentraciones nitrogenadas y sombreado no influyeron significativamente en la concentración de azúcares (Figura 4.16).

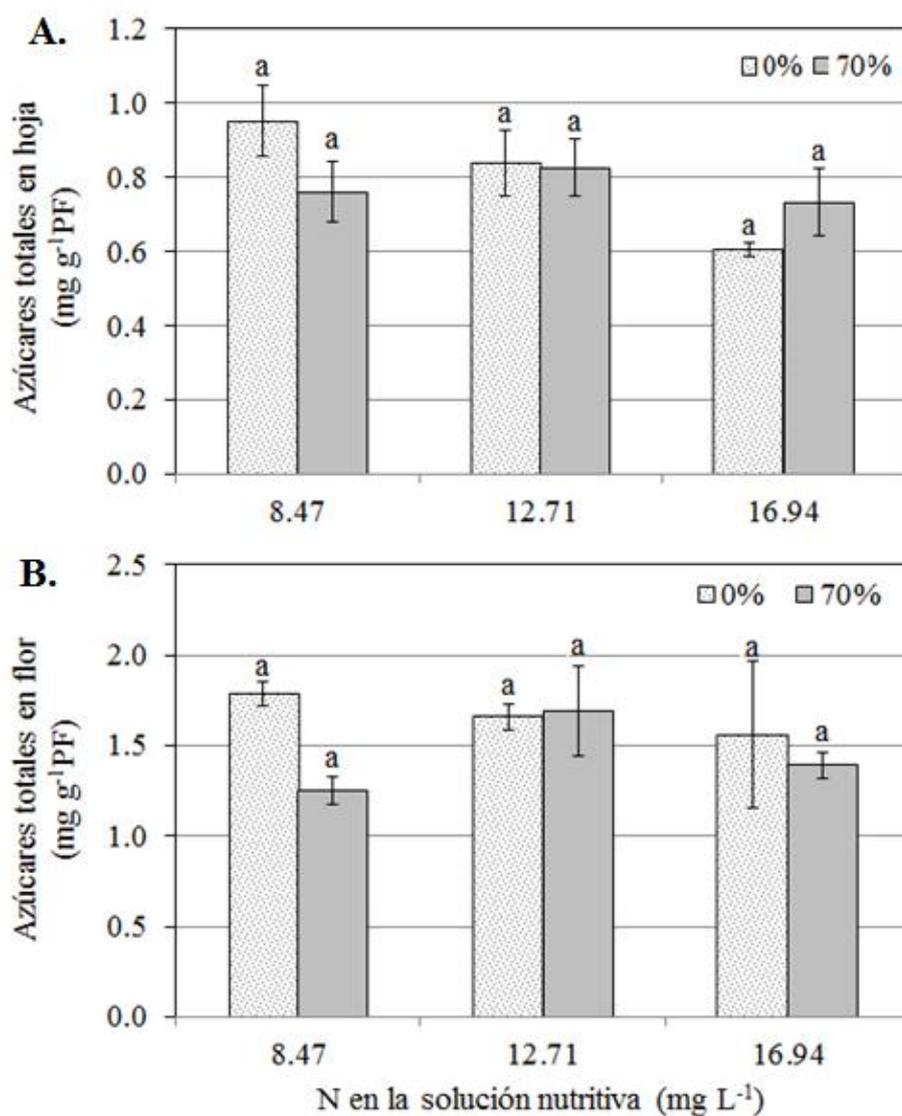


Figura 4.16 Azúcares totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.9. Aminoácidos libres totales en hojas y flores

4.3.9.1. Efecto principal del factor nitrógeno

En hojas, la concentración de aminoácidos libres totales fue directamente proporcional con la concentración de N adicionada a la solución nutritiva, teniendolas plantas con la menor dosis de N evaluada (8.47 mg L⁻¹) sólo el 80.25 % de la concentración registrada con la

dosis alta de N (16.94 mg L^{-1}) (**Figura 4.17A**). En flores, de manera similar el tratamiento con menor dosis de N tuvo solo 33.06 % de la concentración de aminoácidos libres que la mostrada en plantas tratadas con la dosis alta de N evaluada (**Figura 4.17B**). Los resultados coinciden con lo reportado por Meuriot *et al.* (2003) en dos experimentos con alfalfa; en el primero evaluaron dos tratamientos N óptimo y N-limitado; en el segundo experimento, se evaluaron concentraciones decrecientes de NH_4NO_3 (1000, 250, 100 o 50 mM), concluyen que las concentraciones de aminoácidos en raíces pivotantes aumentaron al incrementar la dosis de N en ambos experimentos. Así mismo, en espinaca asperjada con urea foliar al 2 %, se reporta que la concentración de aminoácidos libres incrementa tanto en hojas como en raíces (Trejo-Téllez *et al.*, 2005).

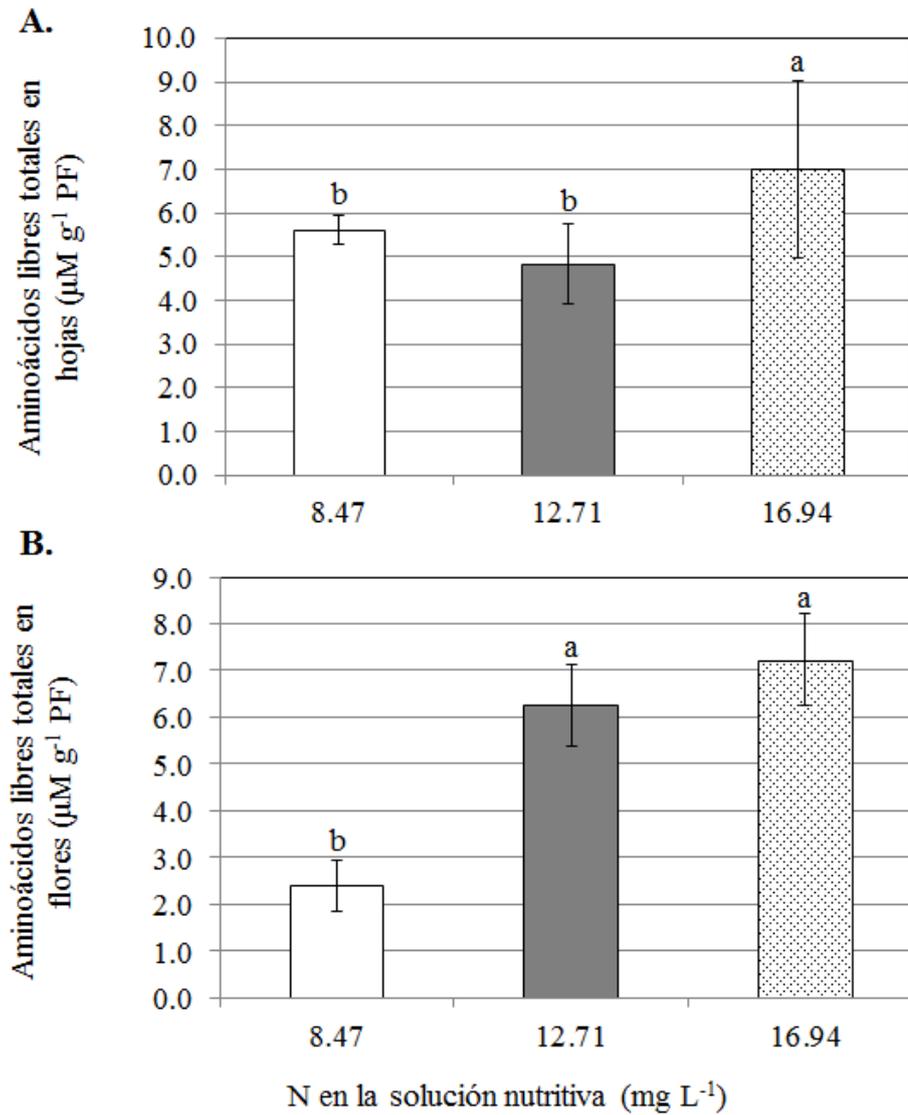


Figura 4.17 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indicandiferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.9.2. Efecto principal del sombreado

En hojas de plantas sometidas a un 70 % de sombreado, la concentración de aminoácidos libres totales fue significativamente superior a plantas sin sombreado, superándolas en 59.75 % (**Figura 4.18A**). Por el contrario en cabezuelas, la concentración de aminoácidos fue superior significativamente en el tratamiento sin sombreado (**Figura 4.18B**). Khaleafa *et al.* (1982) reportan en una alga (*Caulerpa prolifera*) que a intensidades bajas de luz, la concentración de aminoácidos libres fueron mayores en comparación con los conjugados a excepción de fenilalanina y leucina; caso contrario, a altas intensidades de luz los aminoácidos conjugados fueron mayores que los libres excepto arginina, glicina y tirosina; esto pudo haber sucedido en nuestro estudio un tipo de aminoácidos predominó en hojas al incrementar el porcentaje de sombreado y viceversa en cabezuelas.

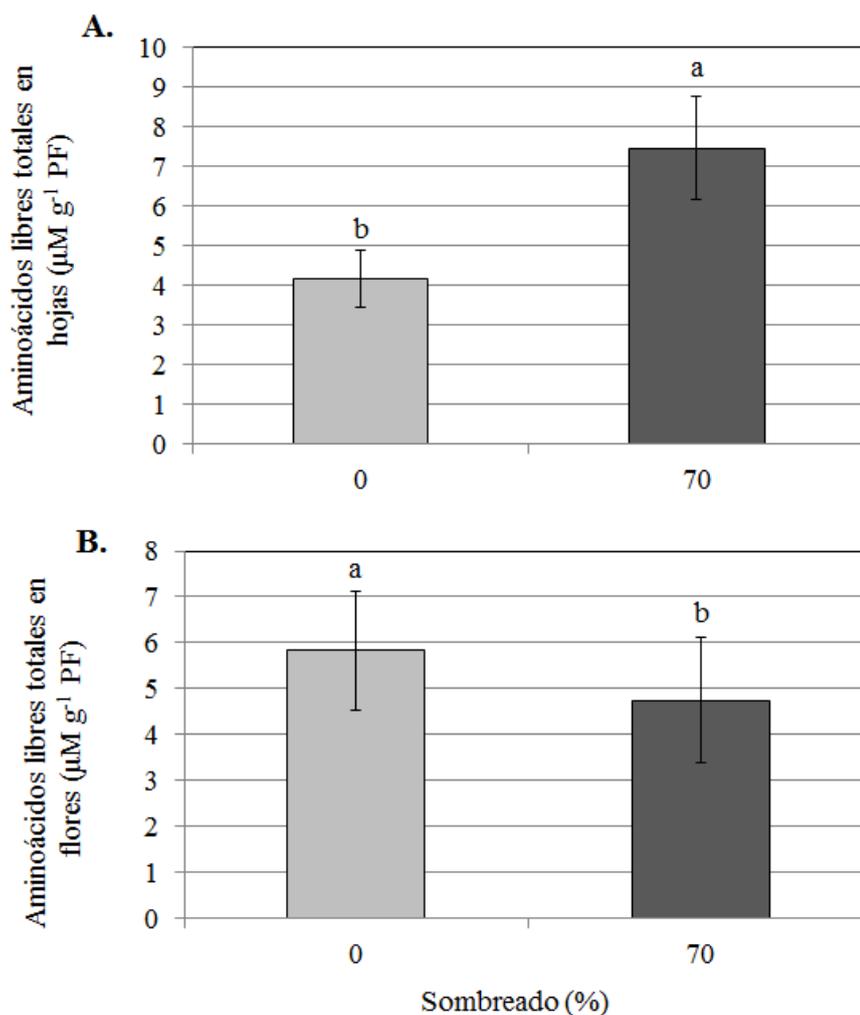


Figura 4.18 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.9.10. Efecto de la interacción de los factores de estudio (nitrógeno X sombreado)

La concentración foliar de aminoácidos fue estadísticamente superior en el tratamiento consistente en la dosis de N de 16.94 mg L^{-1} con un sombreado de 70 % (**Figura 4.19A**). En flores, se observa de manera general que las concentraciones de aminoácidos libres incrementan conforme aumenta la dosis de N adicionada a la solución nutritiva (**Figura 4.19B**).

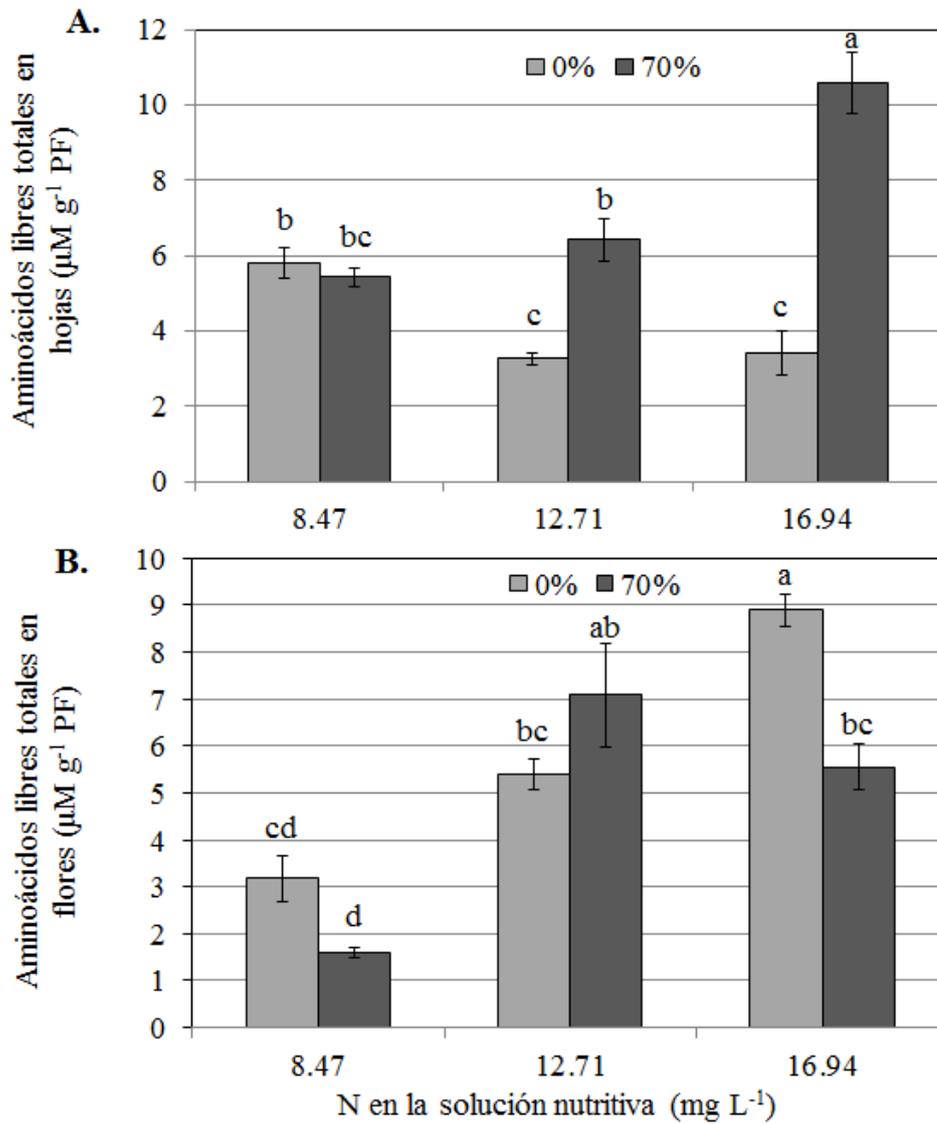


Figura 4.19 Aminoácidos libres totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración durante 40 días. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.10. Proteínas solubles totales en hojas y flores

4.3.10.1. Efecto principal del factor nitrógeno

La concentración de proteínas solubles totales no fueron significativamente diferentes entre tratamientos de nitrógeno, tanto en hojas como en flores. Sin embargo, en hojas, su concentración fue ligeramente superior con la adición de N a razón de 8.47 y 12.71 mg L⁻¹ a la solución nutritiva (**Figura 4.20A y 4.20B**). Contrario en cabezuelas, ligeros incrementos en la concentración de proteínas se tuvieron en el nivel más alto de N 16.94 mg g L⁻¹ (**Figura 4.20B**).

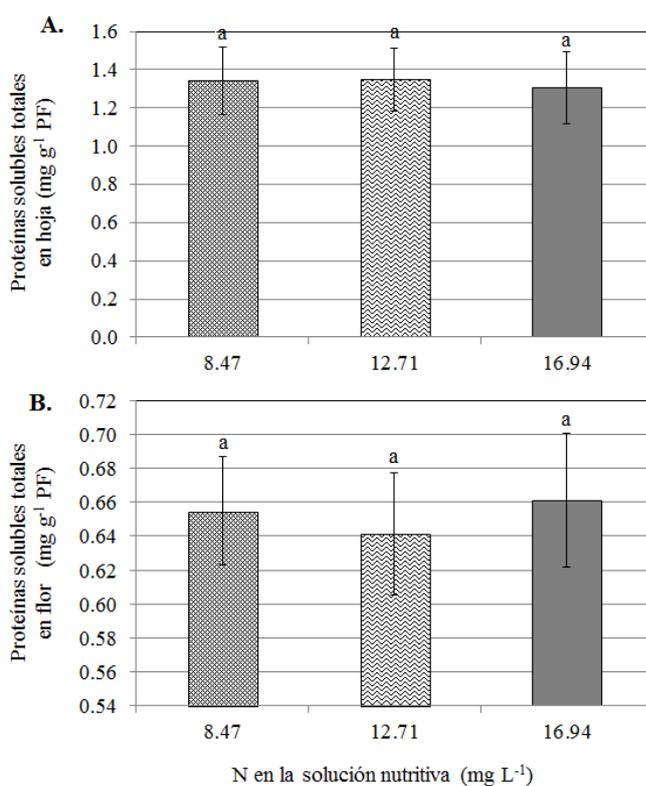


Figura 4.20 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes niveles de nitrógeno en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.3.10.2. Efecto principal del factor sombreado

Las plantas no sombreadas presentaron concentraciones de proteínas libres totales estadísticamente superiores a plantas sombreadas, tanto en hojas (**Figura 4.21A**) como en flores (**Figura 4.21B**). De igual manera a lo reportado por Loreto *et al.* (2003), quienes evaluaron la irradiación a 78, 156 y 238 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en cianobacterias del género *Anabaena*, donde concluyen que la irradiación ejerció influencia en el contenido de proteínas siendo mayor éste a 156 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

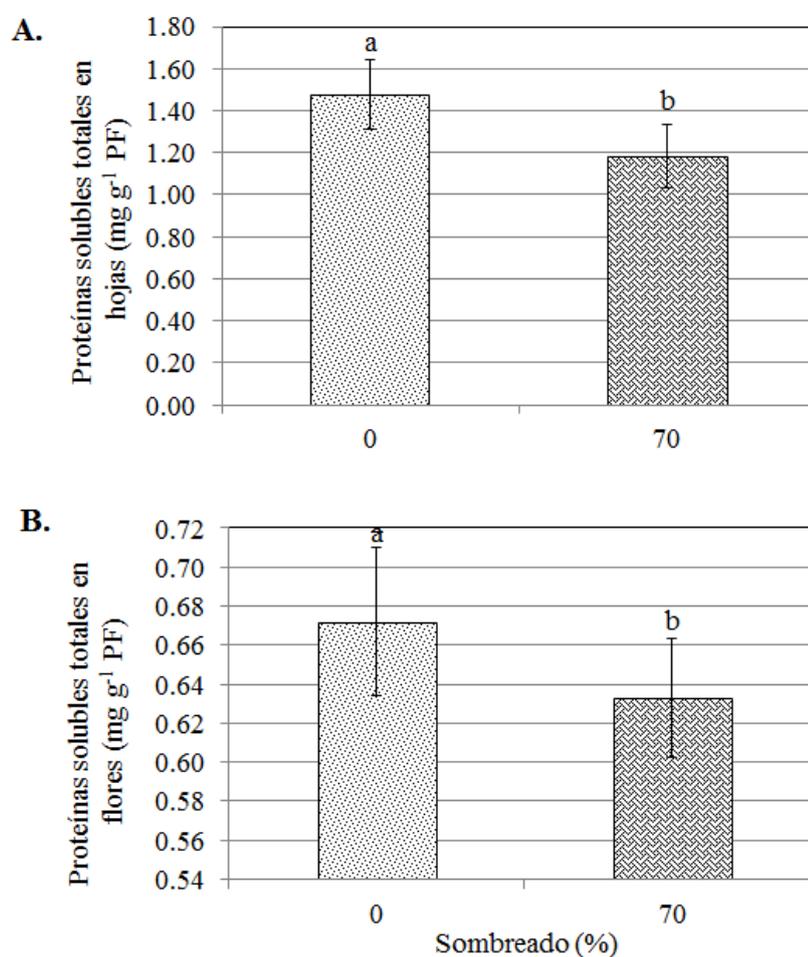


Figura 4.21 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con dos porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

Así también Eckardt *et al.* (1997) propusieron dos condiciones de iluminación, alta ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y baja ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) donde evaluaron el contenido de proteínas en plantas silvestres y plantas mutantes con reducida actividad de ribulosa fosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) de *Arabidopsis thaliana*. Estos autores concluyen que en ambos tipos de plantas, la baja luminosidad redujo significativamente el contenido de proteínas.

4.3.10.3. Efecto de la interacción de factores de estudio (nitrógeno X sombreado)

En la **Figura 4.22A** se muestran los resultados de la concentración foliar de proteínas en función de la interacción de los factores de estudio; en esta se observan tendencias crecientes a medida que aumenta la concentración de nitrógeno en la solución nutritiva solo en plantas con sombreado. Contrario a lo anterior, a medida que la concentración de nitrógeno se incrementa bajo condiciones de sombreado al 70 %, se reduce la concentración folia de proteínas. En flores, la interacción de los factores de estudio no fue significativa en la variable concentración de proteínas (**Figura 4.22B**).

Los resultados aquí encontrados en hojas, coinciden con lo reportado por Ramvlov *et al.* (2011) en la macroalga *Gracilaria domingensis* donde, al ser tratada con dos concentraciones de nitrato (125 y 250 μmol) y dos densidades de flujo de fotones (50 ± 5 y $100 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), los autores concluyen que alta dosis de nitrógeno y alto flujo de fotones estimularon la acumulación de proteínas solubles totales.

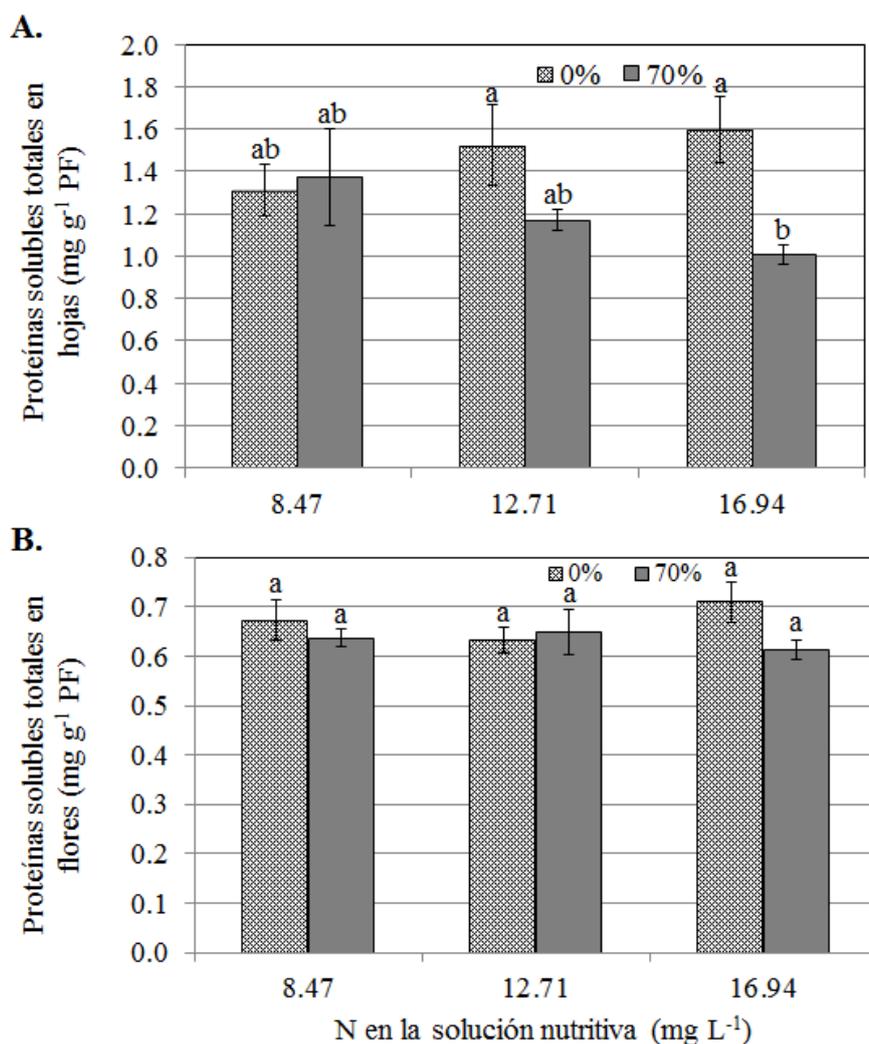


Figura 4.22 Proteínas solubles totales en hojas (A) y flores (B) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas por 40 días con diferentes niveles de N y dos porcentajes de sombreado en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos. PF=peso fresco.

4.4. CONCLUSIONES

Las variables morfológicas después de 15 días de tratamientos no fueron afectadas por efectos principales de factores de estudio y su interacción; así también no existieron efectos significativos en esta investigación en las variables biomasa seca, clorofilas y azúcares totales.

La concentración de nitrógeno afectó de manera significativa la concentración de aminoácidos totales libres en hojas, carotenoides totales en flor; así también el nitrógeno influenció la concentración de flavonoides totales, teniéndose mayor valor de ésta con una dosis de 8.47 mg L⁻¹.

El sombreado afectó la absorción de N en flores y raíces, obteniéndose las medias más altas con 70 % de sombreado. En hojas y tallos, la mayor concentración de N se obtuvo en plantas no sombreadas. Las concentraciones de K en hojas, tallos y raíces fueron superiores en plantas sin sombreado; mientras que en flores en plantas sin sombreado. Los carotenoides, flavonoides totales aminoácidos libres totales en hojas incrementaron significativamente con el sombreado de 70 %; por el contrario los aminoácidos libres totales en flores y proteínas solubles totales en hojas y flores fueron superiores en plantas sin sombreado.

La interacción de los niveles más altos de nitrógeno y sombreado favoreció la concentración de N, flavonoides totales y aminoácidos libres totales en hojas, teniéndose efecto positivo con dosis de 16.94 mg L⁻¹ a 70 % de sombreado. En flores se registró la mayor concentración de aminoácidos libres totales en plantas sin sombreado la dosis más alta de N.

La técnica GS/MS permitió identificar 17 compuestos diferentes en los distintos órganos de la planta de *T. erecta* var. Inca. En hojas se presentaron cuatro componentes consistentes en todos los tratamientos de manera independiente del nivel de nitrógeno y porcentaje de sombreado se obtuvo: D-limoneno, ocimeno, β-mirceno y α-pineno. El cariofileno se registró en flores. En tallos los componentes de mayor consistencia son: β-farneseno y piperitona. En raíces el β-farneseno.

4.5. LITERATURA CITADA

- Adams F. 1980. Interactions of phosphorus with other elements in soil and plants. *In*:Dinauer RC. (eds.). The Role of Phosphorus in Agriculture. America Society of Agronomy: Madison, WI, pp. 655-680.
- Alcántar GG, Sandoval VM. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial. Núm. 10. SMCS. Chapingo, México. 150 p.
- Baranauskienė R, Venskutonis RP, Viskelis P, Drambrauskienė E. 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of Thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 51(26): 7751-7758.
- Biesiada A, Sokół-Letowska A, Kucharska A. 2008. The effect of nitrogen fertilization on yielding and antioxidant activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.). *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus.* 7(2): 33-40.
- Boroujerdnia M, Alemzadeh N. 2007. Effect of different levels of nitrogen fertilizer and cultivars on growth, yield and yield components of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology* 1:47-53.
- Bouzo CA, Pilatti RA, Favaro JC, Norberto F. 2005. Facultad de Ciencias Agrarias UNL Gariglio. Cultivo de tomate en invernadero alternativas para el control de temperaturas extremas. 137-141. Disponible en línea en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210935.pdf>. Consultado el 29 de Junio 2015.
- Bremner MJ. 1965. Total nitrogen. *In*:Black CA. (ed.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy* 9. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. pp. 1149-1178.
- Casierra-Posada F, Ávila-León OF, Riascos-Ortiz DH. 2012. Cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. *Temas Agrarios* 17(1): 60-71.
- Cedergreen N. 2003. Nitrate reductase activity in roots and shoots of aquatic macrophytes. *Aquatic Botany* 76: 203-212.
- Chaín M, Montesinos A, Verdugo G. 2002. Manejo de postcosecha de flores. *Boletín INIA* No. 82. Temuco, Chile.
- Chamorro ER, Ballerini G, Sequiera AF, Velasco GA, Zalazar MF. 2008. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. Leaves and Flowers. *J. of the Argentine Chem. Society* 96: 80-86.
- Chenard CH, Kopsell DA, Kopsell DE. 2005. Nitrogen concentration affects nutrient and carotenoid accumulation in parsley. *Journal of Plant Nutrition* 28(2): 285-297.
- Ciccio JF. 2004. A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52: 853-857.
- Del Pozo PP, Herrera RS, García M. 2002. Dinámica de los contenidos de carbohidratos y proteína bruta en el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con aplicación de nitrógeno y sin ella. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 36:275-280.
- Dymova OV, Golovko TK. 2007. Pigment apparatus in *Ajuga reptans* plants as affected by adaptation to light growth conditions. *Russian Journal of Plant Physiology* 54(1): 39-45.
- Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7(18): 3188-3192.
- Eckardt NA, Snyder GW, Portis AR, Ogren WL. 1997. Growth and photosynthesis under high and low irradiance of *Arabidopsis thaliana* antisense mutants with reduced Ribulosa-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase content. *Plant Physiol.* 113: 575-586.
- Elorza-Martínez P, López-Herrera M, Hernández-Fuentes AD, Olmedo-Pérez G, Domínguez-Barradas C, Maruri-García JM. 2007. Efecto del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (*Vainilla planifolia* Andrewz) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista UDO Agrícola* 7(1): 228-236.
- Evangelista-Lozano S, Ubaldo-Suárez D, Camacho-Díaz BH, Arenas-Ocampo ML, Del Villar-Martínez AA, García-Jiménez F, Jiménez-Aparicio A. 2011. Estudio del desarrollo, calidad de planta y acumulación de pigmentos en lígulas de *Tagetes erecta* L. expuestas a dos intensidades de luz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(5): 476-488.

- Flores-López R, Sánchez-del Castillo F, Rodríguez-Pérez JE, Mora-Aguilar R, Colinas-León MT, Lozoya-Saldaña, H. 2008. Influencia de la radiación solar en la producción de semilla-tubérculo de papa bajo cultivo sin suelo. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1): 25-30.
- Forde BG. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 219-235.
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 21: 253-268.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(3): 227-281.
- Gierth M, Maser P. 2007. Potassium transporters in plants involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. Department of Horticulture and Landscape architecture. HORT640-Metabolic Plant Physiology. *FEBS Lett.* 581: 2348-2356.
- Gil A, Ghersa CM, Leicach S. 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 261-274.
- Guarnaschelli AB, Mamtase AI, Battaglia A. 2009. Cambios anatómicos y morfológicos en plántulas de *Eucalyptus* sp. en respuesta a diferentes niveles de luz. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 44(3-4):273-285.
- Harbone JB. 1973. Chlorophyll extraction. *In: Harbone JB. (ed.). Phytochemical Methods. Recommended technique.* Chapman and Hall, London. pp. 205-207.
- Hernández J, Escobar I, Castilla N. 2001. La radiación solar en invernaderos mediterráneos. *Horticultura Global Rev. Industria, Distribución y Socioeconómica Hortícola* 157: 18-27.
- Hernández-Bastida V, Mora-Vivas F, Rojas-Fermín L, Meléndez Pablo. 2014. Análisis del aceite esencial de las hojas de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae). *Rev. Fac. Farm.* 56(1): 18-20.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 210-218.
- Höfner R, Vásquez-Moreno L, Abou-Mandour AA, Bohnert HJ, Schmitt JM. 1989. Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 803-810.
- Huber C. 1994. Estudio de tratamientos de conservación de postcosecha de flores de gladiolo (*Gladiolus hybridus*). Tesis de Maestría. Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias 121 p.
- Kaiser WM, Huber SC. 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers *Journal of Experimental Botany* 52: 1981-1989.
- Karimi E, Jaafar HZE, Ghasemzadeh A, Ibrahim MH. 2013. Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth. *Australian Journal of Crop Science* 7(7): 1016-1023.
- Karousoo D, Koureas DN, Kokkini S. 2005. Essential oil composition is related to the natural's habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in natura 2000 sites of Crete. *Phytochem.* 66: 2668-2673.
- Khaleafa AF, Mohsen AF, Shaalan SH. 1982. Effect of different light intensities on growth, amino-acid, fat and sugar concentrations in *Caulerpa prolifera* (Foerskal) Lamouroux. *Hydrobiological Bulletin* 16(2-3): 207-212.
- Kopsell DA, Kopsell DE, Curran CJ. 2007. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 900-907.
- Krishna A, Mallavarapu GR, Kumar S, Ramesh S. 2002. Volatile oil constituents of the capitula, leaves and shoots of *Tagetes patula* L. *J. of Essential Oil Res.* 14: 433-436.
- Król B. 2011. The effect of different nitrogen fertilization rates on yield and quality of marigold (*Calendula officinalis* L. Tokaj) raw material. *Acta Agrobotanica* 64(3): 29-34.
- Li J, Gao J., Jiang M. 2013. The effect of light on nitrate uptake by wheat roots. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82(3): 207-210.
- Loreto C, Rosales N, Bermúdez J, Morales E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Bot.* 60(2): 83-89.

- Macías AF, Galindo CGJ. 2001. Terpenoides alelopáticos: estructura, actividad y aplicaciones. *In*: Anaya AL, Espinoza GFJ, Cruz OR. Relaciones Químicas entre Organismos. Aspectos básicos y perspectivas. Instituto de Ecología. pp. 137-161.
- Manzano-Santana P, Miranda M, Gutiérrez Y, García G, Orella T, Orellana-Manzano A. 2011. Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L) Cronquist (canilla de venado). *Rev. Cubana Plant Med.* 16(1): 13-23.
- Marschner P. 2005. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 3ra ed. United States of America, 645 p.
- Medina AG, de Amézquita OM, Bolívar LJ, Ramírez PJ. 1999. Acumulación y concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en *Gysophila paniculata* L. cv. Perfecta. *Agronomía Colombiana* 16(1-3): 46-50.
- Meuriot F, Avice JC, Decau ML, Simon JC, Lainé P, Volenec JJ, Ourry A. 2003. Accumulation of reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. *Plant Science* 165: 709-718.
- Mills HA, Benton J. 1996. Plant Analysis Handbook II a practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Inc. Georgia USA. 415 p.
- Mohd HI, Jaafar HZE. 2011. Involvement of carbohydrate, protein and phenylalanine ammonia lyase in up-regulation of secondary metabolites in *Labisia pumila* under various CO₂ and N₂ levels. *Molecules* 16: 4172-4190.
- Moore S, Stein W.H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211: 893-906.
- Mumivand H, Babalar M, Hadian J, Tabatabaee MF. 2011. Plant growth and essential oil content and composition of *Satureja hortensis* L. cv. Saturn in response to calcium carbonate and nitrogen application rates. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(10): 1859-1866.
- Nagata M, Yamashita I. 2002. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39: 925-928.
- Nanyonga SK, Opoku AR, Lewu FB, Oyedeji OO, Singh M, Oyedeji AO. 2013. Antioxidant activity and cytotoxicity of the leaf and bark extracts of *Tarconanthus camphorates*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 377-383.
- Ngai N, Coruzzi G. 1998. Dissecting light repression of asparagine synthetase gene in Arabidopsis. *In*: LoSchiavo F, Raikhel N, Last R, Morelli G (eds.). Cellular Integration of Signaling Pathways in Plant Development Springer Verlag Amsterdam. pp. 147-157.
- Ogunwande IA, Olawore NO. 2006. Essential oil from the leaves and flowers of "African Marigold", *Tagetes erecta* L. *J. Essential Oil Res.* 18: 366-368.
- Oliveira IC, Brenner E, Chiu J, Hsieh M-H, Kouranov A, Lam H-M, Shin MJ, Coruzzi G. 2001. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 567-575.
- Páez A, Gebre GM, Gonzalez ME, Tschaplinski TJ. 2000. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of Aloe vera plants exposed to three irradiance levels. *Environmental and Experimental Botany* 44: 133-139.
- Pal P, Ghosh P. 2010. Effect of different sources and levels of potassium on growth, flowering and yield of African marigold (*Tagetes erecta* Linn.) cv. "Siracole" Indian J. Natural Products Res. 1(3): 371-375.
- Pérez-Asseff JM, Peña-Salamanca EJ, Torres-González C. 2007. Efecto del nitrógeno y la irradiación en la eficiencia fotosintética del anamú *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 31(118):49.55.
- Politycka B, Golcz A. 2004. Content of chloroplast pigments and anthocyanins in the leaves of *Ocimum basilicum* L. depending on nitrogen doses. *Horticulturae* 16(1):23-29.
- Porto SRM, Deitos FD, Vieira PJ, Bonomo P, Silva SL, Nascimento CC, Rodriguez BPH, Santos BM. 2013. Chlorophyll and carbohydrates in *Arachis pintoi* under influence of water regimes and nitrogen fertilization. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42(6): 388-394.
- Raal A, Arak E, Orav A, Ivask K. 2003. Comparación de aceites esenciales de *Matricaria recutita* L. de origen diverso. *Ars Pharmaceutica* 44(2): 159-165.
- Rahmani NT, Taherkhani T, Zandi P, Moradi A. 2011. Effect regulated deficit irrigation and nitrogen levels on flavonoid content and extract performance of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Annals of Biological Research* 3(6): 2624-2630.

- Ramlov F, Souza JMC, Faria AVF, Maraschin M, Horta PA, Yokoya NS. 2011. Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilareales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(2):255-261.
- Sagar DV, Naik SN, Rout PK, Rao YR. 2005. Composition of essential oils of *Tagetes patula* L. growing in Northern India. *J. Essential Oil Res.* 17: 446-448.
- Salvador VP, Planelles R, Enríquez E, Rubira P, Mucharanz. 2001. Influencia de la fertilización y el sombreado en el vivero sobre la calidad de la planta de *Quercus ilex* L. y su desarrollo en campo. *Actas de III Congreso Forestal Español*. Granada. Mesa 3: 770-776.
- Samarakoon SP, Wilson JR, Shelton HM. 1990. Growth, morphology and nutritive quality of shaded *Stenotaphrum secundatum*, *Axonopus compressus* and *Pennisetum clandestinum*. *The Journal of Agricultural Science* 114(2): 161-169.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Sefidkon F, Salehyar S, Mirza M, Dabiri M. 2004. The essential oil of *Tagetes erecta* L., occurring in Iran. *Flavour and Fragrance J.* 19: 579-581.
- Serrato-Cruz MA, Díaz CF, Barajas PJS. 2008. Composición en el aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. *Agrociencia* 42: 277-285.
- Sifola MI, Barbieri G. 2006. Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Sci. Hortic.* 108: 408-413.
- 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.
- Southgate DA. 1976. Determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers. LTD. London. 105 p.
- Steiner A. 1984. The universal nutrient solution. *In: I. S. O. S. C. Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture, the Netherlands*. pp. 633-649.
- Stoklosa A, Matraszek R, Isman MB, Up adhyaya M. 2012. Phytotoxic activity of clove oil, its constituents, and its modification by light intensity in broccoli and common lambsquarters (*Chenopodium album*). *Weed Science* 60: 607-611.
- Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC, Rodríguez-Mendoza MN, Alcantar-González G. 2005. Fertilización foliar con urea en la partición de nitrógeno en espinaca. *Terra Latinoamericana* 23(4): 495-503.
- Trejo-Téllez LI, Peralta-Sánchez MG, Gómez-Merino FC, Rodríguez-Mendoza MN, Serrato-Cruz MA, Arévalo-Becerril AE. 2013. Cloruro de sodio sobre biomasa seca y absorción de cationes macronutrientes en cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 979-990.
- Ubaldo-Suárez D. 2007. Efecto de la luz en el desarrollo y en la acumulación de carotenoides en lígulas de *Tagetes erecta* L. Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. 89 p.
- Vázquez AM, Aymar ML, Demmel GI, Criado SG, Ruiz GM, Cantero JJ, Rossi LI, Velasco MI. 2011. Determination of volatile organic compounds of *Tagetes argentina* Cabrera (Asteraceae) using HS-SPME analysis. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(5): 463-469.
- Warren MJ, Bassman J, Fellman JK, Mattinson DS, Eigenbrode S. 2003. Ultraviolet-B radiation of *Populus trichocarpa* leaves. *Tree Physiol* 23: 527-535.
- Yahya A. 1996. Effects of fertilizer rate on leaf nutrient composition, growth, flowering and quality of marigold plants. *MARDI Res. J.* 24 (1): 13-18.