

**EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN CON MACRO Y MICRONUTRIENTES EN  
EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE *Caliphruria subdentata* Baker Y EN  
SU CONTENIDO DE GALANTAMINA**



**WILLIAM ALBERTO LUBO GÓMEZ  
CARLOS ANDRÉS VALENCIA BENAVIDES**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2016**

**EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN CON MACRO Y MICRONUTRIENTES EN  
EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE *Caliphruria subdentata* Baker Y EN  
SU CONTENIDO DE GALANTAMINA**

**WILLIAM ALBERTO LUBO GÓMEZ  
CARLOS ANDRÉS VALENCIA BENAVIDES**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Biólogo**

**Director:**

**OSCAR DARÍO BERMÚDEZ ZAMBRANO. M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2016**

Nota de aceptación

---

---

---

Director \_\_\_\_\_  
Óscar Darío Bermúdez Zambrano. M.Sc

Jurado \_\_\_\_\_  
Diego Jesús Macías Pinto. M.Sc

Jurado \_\_\_\_\_  
Nelson Bolívar Rojas Martínez. M.Sc

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 03 de Febrero de 2016

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	<b>3</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	5
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
<b>6. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
6.1. GENERALIDADES SOBRE LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE .....	6
6.1.1. Taxonomía .....	6
6.1.2. Características Morfológicas .....	6
6.1.3. Distribución Geográfica.....	7
6.1.4. Aspectos Ecológicos y Fenológicos .....	7
6.2. GENERALIDADES SOBRE NUTRICIÓN EN PLANTAS.....	8
6.2.1. Función de los Minerales Tomados por las Plantas .....	8
6.2.2. Obtención de Nutrientes por Parte de la Planta .....	8
6.2.2.1. Proceso de Absorción de Nutrientes del Suelo .....	9
6.2.3. Procedimiento para el Cálculo de las Cantidades de Nutrientes Requeridas por un Cultivo .....	10
6.3. METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS .....	11
6.4. GENERALIDADES SOBRE LOS ALCALOIDES .....	11
6.4.1. Distribución de Alcaloides en el Reino Vegetal .....	12
6.4.2. Actividad Biológica de los Alcaloides .....	12
6.4.3. Alcaloides del Tipo Galantamina .....	12

6.4.4. Distribución de Alcaloides en la Familia Amaryllidaceae.....	13
6.5. ANTECEDENTES.....	14
<b>7. MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>16</b>
7.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	16
7.2. MÉTODOS.....	17
7.2.1. Análisis de Suelo.....	17
7.2.1.1. Cantidad de Nutrientes Requeridos para el Ensayo.....	18
7.2.2. Establecimiento del Ensayo .....	21
7.2.3. Etapa de Seguimiento del Ensayo .....	21
7.2.4. Variables a Considerar en el Estudio .....	21
7.2.5. Medición de Variables .....	21
7.2.6. Descripción Fenológica de plantas de Caliphurria subedentata Baker, cultivadas en condiciones de sotobosque.....	23
7.2.6.1. Descripción de las Etapas Fenológicas .....	23
7.2.7. Tratamientos, Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	23
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
8.1. ANÁLISIS DE VARIABLES DE CRECIMIENTO.....	24
8.1.1. Área Foliar, Altura de la Planta, Tiempo de Crecimiento.....	24
8.1.2. Número de Hojas y de Bulbos .....	32
8.1.3. Peso Fresco y Seco de Hojas Bulbos y Raíces .....	35
8.2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE GALANTAMINA EN HOJAS Y BULBOS .....	38
8.3. RELACIÓN ENTRE EL CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO DE GALANTAMINA EN LAS PLANTAS FERTILIZADAS .....	40

8.4. DESCRIPCIÓN FENOLÓGICA DE PLANTAS DE <i>Caliphruria</i> <i>subedentata</i> BAKER, CULTIVADAS EN CONDICIONES DE SOTOBOSQUE .....	41
8.4.1. Etapa Vegetativa .....	41
8.4.2. Etapa Reproductiva.....	46
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>10. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>12. ANEXO .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura básica de los alcaloides tipo Galantamina. Tomada de Cabezas (2002)..	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Localización del Jardín Botánico Álvaro José Negret, lugar donde fueron establecidas en condiciones de sotobosque las plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , sometidas a tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Área foliar promedio estimada en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Altura promedio alcanzada en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Tiempo necesario para alcanzar la longitud total máxima en la segunda hoja desarrollada en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> fertilizadas con macro y micronutrientes.	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> Tiempo requerido para alcanzar la longitud máxima promedio en la lámina de la segunda hoja desarrollada en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , fertilizadas con macro y micronutrientes.	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Tiempo requerido para alcanzar el ancho máximo promedio en la segunda hoja desarrollada en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> fertilizadas con macro y micronutrientes.	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b> Bulbos secundarios desarrollados en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> establecidas sin fertilización (testigo absoluto) y con fertilización de micronutrientes. El número del bulbo corresponde a la numeración asignada a las unidades experimentales.	<b>34</b>
<b>Figura 9.</b> Peso fresco y seco promedio en hojas de <i>Caliphruria subedentata</i> en los tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes aplicados	<b>36</b>
<b>Figura 10.</b> Peso fresco y seco promedio de bulbos de <i>Caliphruria subedentata</i> en los tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes aplicados	<b>36</b>
<b>Figura 11.</b> Peso fresco y peso seco promedio en raíces de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> en los diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes aplicados.	<b>37</b>

<b>Figura 12.</b> Contenido de galantamina en hojas y bulbos de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.....	<b>39</b>
<b>Figura 13.</b> Representación gráfica del crecimiento en ancho y longitud de una hoja, observado en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> desarrolladas sin fertilización, y en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca.....	<b>44</b>
<b>Figura 14.</b> Hojas de <i>Caliphruria subedentata</i> en diferentes estados de desarrollo, en plantas establecidas en condiciones de sotobosque en el Jardín botánico de la Universidad del Cauca, a) primera hoja en emergencia, b) hoja adquiriendo la forma típica con inicio del desarrollo del peciolo, c) hoja con relación a las anteriores en estado de desarrollo más avanzado y d) hoja en estado de madurez. ....	<b>45</b>
<b>Figura 15.</b> Etapa reproductiva en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , que fueron sembradas sin fertilización y en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca. En algunas plantas, antes de la emergencia de la primera hoja, emergió el escapo. ....	<b>47</b>
<b>Figura 16.</b> Estructuras reproductivas de <i>Caliphruria subedentata</i> en diferentes estados de desarrollo, en plantas establecidas sin fertilización y condiciones de sotobosque en el jardín botánico de la Universidad del Cauca, a) inicio de la floración con la emergencia del escapo, b) escapo en crecimiento y c) flores en diferentes estados de desarrollo.....	<b>47</b>
<b>Figura 17.</b> Frutos y flores en diferentes estados de desarrollo, en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> establecidas sin fertilización y condiciones de sotobosque, en el jardín botánico de la Universidad del Cauca .....	<b>48</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Presencia de la Galantamina en plantas de géneros pertenecientes a la familia Amaryllidaceae. Modificada de Cabezas (2002).....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Cantidad de macronutrientes presente en el suelo, empleado como sustrato para el establecimiento de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes. ....	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Cantidad de micronutrientes presente en el suelo, empleado como sustrato para el establecimiento de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes. ....	<b>18</b>
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de pureza y de eficiencia correspondiente a diferentes elementos minerales, aplicados a plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> como tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes. ....	<b>20</b>
<b>Tabla 5.</b> Cantidad de diferentes elementos minerales suministrada a plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , a manera de tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes. ....	<b>20</b>
<b>Tabla 6.</b> Análisis estadístico de las variables área foliar y altura estimadas en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes. ....	<b>24</b>
<b>Tabla 7.</b> Análisis estadístico de la variable tiempo de crecimiento requerido para alcanzar el ancho, la longitud de la lámina foliar y longitud total de la segunda hoja desarrollada en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , sometidas a tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes. ....	<b>25</b>
<b>Tabla 8.</b> Número de hojas desarrolladas en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.. ....	<b>33</b>
<b>Tabla 9.</b> Número de bulbos desarrollados en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes .....	<b>34</b>
<b>Tabla 10.</b> Análisis estadístico para las variables peso fresco y peso seco en hojas, bulbos y raíces de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.....	<b>35</b>
<b>Tabla 11.</b> Concentración de galantamina en hojas y bulbos de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes .....	<b>38</b>

<b>Tabla 12.</b> Análisis de correlación entre variables asociadas al crecimiento y el contenido de galantamina en hojas y bulbos de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , fertilizadas con macro y micronutrientes .....	<b>41</b>
<b>Tabla 13.</b> Variables fenológicas estimadas en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , desarrolladas sin fertilización en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca .....	<b>42</b>
<b>Tabla 14.</b> Variables fenológicas estimadas en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , fertilizadas con macro y micronutrientes y desarrolladas en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico Universidad del Cauca .....	<b>43</b>
<b>Tabla 15.</b> Variables morfométricas estimadas en la primera hoja de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> desarrolladas sin fertilización, en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca. ....	<b>43</b>
<b>Tabla 16.</b> Variables morfométricas estimadas en la segunda hoja de plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> , fertilizadas con macro y micronutrientes y desarrolladas en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca.....	<b>44</b>
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de individuos en cada estado fenológico, observado en plantas de <i>Caliphruria subedentata</i> establecidas sin fertilización y condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico Universidad del Cauca .....	<b>45</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por permitirnos estar aquí.

A nuestras familias, especialmente a nuestras madres por su apoyo incondicional.

A nuestro director Óscar Bermúdez por compartir sus conocimientos con nosotros y por su paciencia.

Al profesor Fabio Cabezas y los miembros del grupo de investigación de Química de Compuestos Bioactivos (QCB), a la profesora Isabel Bravo y al profesor Jimmy Guerrero, por sus aportes para la ejecución de esta investigación.

Al personal del Jardín Botánico Álvaro José Negret, por facilitar las instalaciones para la realización del trabajo de campo del ensayo y por su colaboración en el mantenimiento del mismo.

Al ingeniero José Polanía del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por facilitar y asesorar en el uso del medidor de área foliar.

A la doctora Elena Stashenko, directora del Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) de la Universidad Industrial de Santander, por su colaboración para la realización del análisis cromatográfico de la galantamina.

A nuestros compañeros por todos los momentos compartidos durante la carrera.

## 1. RESUMEN

*Caliphruria subedentata*, junto con otras especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, han llamado la atención por su capacidad para sintetizar alcaloides con importante actividad biológica, entre ellos la galantamina, un inhibidor selectivo de la acetilcolinesterasa, por lo que es usada para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Se desconoce el efecto de la nutrición mineral sobre el crecimiento y el contenido de este metabolito secundario en esta especie, por lo que es importante realizar un estudio que contribuya al conocimiento de su bioquímica y fisiología. En este sentido, se evaluó el efecto de la fertilización con macronutrientes y micronutrientes sobre variables de crecimiento, como área foliar, altura de la planta, número de hojas y bulbos, tiempo de crecimiento, biomasa fresca y seca y el contenido de galantamina en plantas de *Caliphruria subedentata* Baker.

No se observó efecto de los tratamientos de fertilización sobre la mayoría de las variables de crecimiento consideradas, excepto en el tiempo en el que se alcanzó el ancho de la segunda hoja, que se aceleró en el tratamiento con macronutrientes, respecto a los demás tratamientos.

La concentración de galantamina fue mayor en bulbos que en hojas para esta planta, en todos los tratamientos. La fertilización con macronutrientes tuvo un efecto sobre el contenido de galantamina en bulbos, el cual fue superior con respecto a los otros tratamientos, mientras que en las hojas el contenido de galantamina fue ligeramente inferior.

Un estudio fenológico preliminar en plantas sin tratamientos de fertilización fue realizado, complementario a los objetivos iniciales del trabajo. El tiempo de emergencia de la primera hoja ocurrió a los 110 días en promedio, después de la siembra. En la etapa de floración que duró 50 días en promedio, se desarrollaron cuatro flores por planta aproximadamente. La fase de fructificación inició a los 122 días después de la siembra y se produjeron 4 frutos por planta, los cuales no alcanzaron la maduración, dentro del período de seguimiento. No todas las plantas alcanzaron la etapa de floración y fructificación.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las Amarilidáceas son un grupo de monocotiledóneas, constituido por 1100 especies agrupadas en 85 géneros; son una familia extensamente distribuida y sus principales centros de diversidad se encuentran en Sudamérica (especialmente la región Andina), Sudáfrica y en el Mediterráneo (Meerow y Snijman, 1998). Morfológicamente son hierbas perennes, con un bulbo carnoso y subterráneo, raramente con rizomas (*Clivia*, *Scadoxus*), sus hojas son lineares a orbiculares, glabras y caducas, sus flores son actinomorfas, dispuestas en umbelas, con pocas flores o reducidas a una flor solitaria (Cabrera, 1968).

Algunas plantas de la familia Amaryllidaceae han llamado considerablemente la atención ya que sintetizan alcaloides con importante actividad farmacológica (Hoshino, 1998). Un amplio estudio fitoquímico en especies de este grupo taxonómico, ha permitido el aislamiento de alrededor de 500 alcaloides con diversas estructuras químicas y amplia variedad de efectos biológicos (Zhong, 2005). Entre los alcaloides presentes en estas plantas, la galantamina es de los más importantes, debido a que presenta actividad biológica como inhibidor selectivo de la acetilcolinesterasa (Heinrich and Teoh, 2004), por lo que es usado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El crecimiento de las plantas depende de varios factores, que van desde la regulación génica hasta los factores edafoclimáticos. Para una especie vegetal y en un ambiente determinado los factores de crecimiento más importantes son la luz, el agua, el dióxido de carbono y los nutrientes minerales. Al aumentar cualquiera de estos factores se produce un incremento en la producción vegetal, siendo menor la respuesta conforme se sigue aumentando la cantidad del factor aplicado (Gárate y Bonilla, 2008).

El suelo es el soporte natural de las plantas del que las raíces toman el agua y los nutrientes minerales. El potencial de desarrollo de las plantas viene limitado fundamentalmente por la disponibilidad de nutrientes del medio, los cuales tienen que estar en una forma asimilable para que puedan ser absorbidos por las raíces (Gárate y Bonilla, 2008).

### 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Cada genotipo y especie de planta requiere una nutrición mineral óptima para su normal desarrollo (Barrera et al, 2010). La falta de uno o varios de los nutrientes requeridos determina alteraciones en los procesos fundamentales para la vida de las plantas, aunque también el exceso de ciertos minerales en el suelo puede ocasionar trastornos fisiológicos por su toxicidad (Universidad de Buenos Aires, 2008).

Además de ser esencial para el metabolismo primario de las plantas, la nutrición mineral puede influir en la producción de metabolitos secundarios. Independientemente de las características genéticas de una planta, la proporción relativa en que los recursos son utilizados en rutas metabólicas secundarias está fuertemente afectada por deficiencias nutricionales, entre otros factores ambientales (Yaber et al., 2009). Estas deficiencias bien podrían causar un aumento en la producción de uno o varios metabolitos secundarios específicos, o bien disminuir dicha producción.

La familia Amaryllidaceae está conformada por un grupo de plantas, que entre sus características relevantes cuentan con la capacidad de biosíntesis de alcaloides tipo Galantamina. *Caliphruria subdentata* es una especie perteneciente a esta familia de la que se han reportado investigaciones orientadas a su caracterización histológica con fines taxonómicos (Meerow, 1989) y funcionales del tejido fotosintético realizadas con el propósito de hacer una aproximación a la ruta metabólica seguida en el proceso de fijación de carbono (Benavides et al., 2009). Sin embargo, se desconoce la influencia ejercida por elementos esenciales para nutrición mineral sobre el crecimiento y el contenido de metabolitos de uso terapéutico como la Galantamina, por tanto es de gran importancia abordar este aspecto con el propósito de contribuir al conocimiento de la bioquímica y fisiología de esta especie.

#### 4. JUSTIFICACIÓN.

Un conocimiento integral de los requerimientos de las plantas en términos de elementos minerales y de cómo estos se relacionan con su desarrollo, resulta fundamental para el manejo adecuado de cualquier cultivo (Universidad de Buenos Aires, 2008). La manera como estos requerimientos se relacionan a su vez con la producción de metabolitos también es importante debido a la demanda de estos compuestos para el tratamiento de diversas enfermedades y a que la vía de la obtención natural es una opción viable para la extracción de estos compuestos, ya sea puros o en forma de extractos.

Para el caso de la Galantamina, en la actualidad, existen tres alternativas para su obtención, aunque cada una de ellas presenta sus limitaciones: la primera, consiste en la extracción a partir de la planta completa o a partir de los bulbos de distintas especies (Bonner, 1995), alternativa que implica el uso de una cantidad considerable de material vegetal para extraer una cantidad grande del metabolito, lo que podría en última instancia llevar a las especies de plantas productoras del mismo a la extinción. La segunda estrategia es la síntesis química, que consiste en la obtención del precursor de esta molécula que por un proceso fenólico-oxidativo generará los alcaloides tipo Galantamina; la principal dificultad es la poca estereoespecificidad con que transcurren estas reacciones y el bajo rendimiento (Cabezas, 2002), y la tercera alternativa es la biotecnología vegetal, en la que se recurre al cultivo de células u órganos vegetales en biorreactores (Schumann et al., 2012), con la desventaja que la optimización de los medios de cultivo se convierte en una labor dispendiosa, debido al manejo de unas condiciones necesarias y únicas para cada especie como la temperatura, humedad, pH, y cantidad de nutrientes etc. (Lutz et al., 1985).

Debido a que plantas de la familia Amaryllidaceae como *Caliphruria subedentata* producen el metabolito galantamina, resulta interesante evaluar el efecto de la aplicación de macro y micronutrientes sobre su biosíntesis, lo que posiblemente permitirá establecer las condiciones nutricionales óptimas para incrementar el contenido de este alcaloide, pudiendo así obtenerse galantamina empleando cantidades menores de biomasa vegetal.

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. GENERAL

- Evaluar el efecto de la fertilización con macro y micronutrientes sobre el crecimiento y el contenido de Galantamina en plantas de *Caliphruria subedentata* cultivadas en condiciones de sotobosque.

### 5.2. ESPECÍFICOS.

- Determinar el efecto de la fertilización con macro y micronutrientes sobre el crecimiento de plantas de *Caliphruria subedentata* cultivadas en condiciones de sotobosque.
- Cuantificar en *Caliphruria subedentata*, el contenido de Galantamina presente en plantas cultivadas en condiciones de sotobosque y fertilizadas con macro y micronutrientes.
- Establecer la relación existente entre variables asociadas al crecimiento y el contenido de galantamina en las plantas de *Caliphruria subedentata* sometidas a distintos tratamientos de fertilización.

## **6. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES**

### **6.1. GENERALIDADES SOBRE LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE**

La familia Amaryllidaceae, está constituida por un grupo de plantas monocotiledóneas, consistente en alrededor de 1100 especies, pertenecientes a 85 géneros, que se distribuyen ampliamente en los trópicos y regiones del mundo con ambientes calurosos (Willis, 1988). Este grupo taxonómico es una de las 20 familias importantes de plantas, que contienen alcaloides (Zhong, 2005).

#### **6.1.1. TAXONOMÍA**

La familia Amaryllidaceae se ubica dentro de las angiospermas (Clase Magnoliopsida), Subclase Monocotiledoneas, (*Liliidae*), Orden Asparagales, a su vez esta familia se subdivide en 3 subfamilias: Amaryllidoideae, Allioideae, Agapanthoideae (Missouri Botanical Garden, 2012).

#### **6.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS**

Las Amarilidáceas, son hierbas perennes con bulbos subterráneos cubiertos por catáfilos. Las hojas dispuestas basalmente y con un escapo terminal, la lámina foliar puede ser aplanada, dorsiventral y linear, envainadoras en la base, paralelinervias, usualmente glabras. La inflorescencia es una pseudoumbela escaposa, glabra, formada por una o varias cimas helicoideas, aunque en algunos casos se encuentran reducidas a pocas flores o una flor solitaria. Flores actinomorfas a débilmente zigomorfas, bisexuales, trímeras, epíginas, tépalos en dos series de tres, subiguales, usualmente unidos en la base formando un tubo, de color blanco, amarillo, rosado, púrpura o rojo. El fruto es generalmente una cápsula, raramente carnoso e indehiscente. Semillas por lo general más o menos aplanadas, con fitomelano (López y Espejo, 2002).

### 6.1.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

A nivel mundial, la familia Amarillydaceae se distribuye en zonas templadas como el Cáucaso y el Mediterráneo, representada principalmente por los géneros *Galanthus* y *Narcissus*; en la zona tropical hay poblaciones importantes en Centro y Suramérica, constituidas por los siguientes géneros: *Eucharis*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Hippeastrum*, *Crinum* y *Caliphruria* (Dahlgren, 1985). En Colombia, en los departamentos de Valle, Chocó y Risaralda, existen o existían en estado silvestre 8 géneros: *Calicharis*, *Caliphruria*, *Crinum*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Phaedranassa*, *Plagiolirion* y *Zephyranthes*, con menos de 10 especies nativas, todas en peligro de extinción, causado principalmente por destrucción de su hábitat, pérdida de sus dispersores animales, la endogamia y efecto de borde (Silverstone, 2011). En el municipio El Tambo, departamento del Cauca, ha sido reportada la presencia de *Eucharis amazonica*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, material vegetal referenciado en el herbario de la Universidad del Cauca y utilizado para la identificación de alcaloides en especies de esta familia (Cabezas et al. 2002).

### 6.1.4. ASPECTOS ECOLÓGICOS Y FENOLÓGICOS

Todas las especies de *Caliphruria*, exhiben alta especificidad hacia el bosque primario, están adaptadas a condiciones de baja luminosidad y alta humedad relativa (Meerow, 1989). El número de hojas presentes por planta en un momento determinado varía de cero a cuatro, pero usualmente es una o dos, la producción de hojas nuevas ocurre simultáneamente entre varios individuos y se concentra al inicio de cada época lluviosa, en épocas secas es muy lento su desarrollo (Silverstone, 2011). Las especies de *Caliphruria* presentan floración estacional. Observaciones realizadas en invernaderos, por un período de 5 años, confirman una floración de tipo anual para la mayoría de especies de *Caliphruria* (Meerow, 1989).

## **6.2. GENERALIDADES SOBRE NUTRICIÓN EN PLANTAS**

Sólo 13 elementos son considerados esenciales para el desarrollo de la mayoría de las plantas, estos se han dividido en macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y magnesio), los requeridos en relativamente gran cantidad por las plantas y los micronutrientes (hierro, cloro, manganeso, boro, zinc, cobre y molibdeno), aquellos requeridos en menor cantidad. El 90% del peso seco de la mayoría de plantas está constituido por los elementos carbono, oxígeno e hidrógeno; que hace parte del 15% del peso fresco de la planta (el resto es agua), los demás elementos que existen hacen parte del 1,5 % del peso fresco (Howard, 1987).

### **6.2.1. FUNCIÓN DE LOS MINERALES TOMADOS POR LAS PLANTAS**

De los 16 elementos esenciales que requieren las plantas, 13 son tomados por las raíces, (que sería el 4 % aproximadamente de la biomasa acumulada), el carbono, oxígeno e hidrógeno son proporcionados por el CO<sub>2</sub> proveniente de la atmósfera y el agua (Mejía, 2010). Cada elemento nutritivo desempeña una función específica en la nutrición vegetal: el oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre, se convierten en los constituyentes básicos de los tejidos vegetales y biomoléculas, se hacen partícipes en las reacciones básicas del metabolismo, además el fósforo hace parte del ATP, por lo que está ligado a los procesos de intercambio energético. En cuanto a los cationes calcio, potasio y magnesio, regulan el potencial osmótico, la permeabilidad de las membranas celulares y la conductividad eléctrica de las soluciones vegetales y los micronutrientes son catalizadores de las numerosas reacciones del metabolismo vegetal (García-Serrano et al, 2009).

### **6.2.2. OBTENCIÓN DE NUTRIENTES POR PARTE DE LA PLANTA**

Este proceso comienza por la toma de agua y elementos esenciales (minerales) contenidos en el sustrato o suelo, sin olvidar que una parte de esos elementos también provienen de la atmósfera (CO<sub>2</sub>). El órgano vegetal

encargado del proceso son los pelos radiculares de la planta, que establecen un íntimo contacto con la fase sólida (partículas de suelo) y la solución del suelo. La toma de nutrientes por parte de los pelos radiculares, implica un intercambio iónico entre las dos fases (sólida y líquida) del suelo. La fase sólida está compuesta por partículas de arcilla, cargadas negativamente y por materia orgánica sólida, compuesta por cationes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{H}^+$  y la solución del suelo que contiene los aniones  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{Cl}^-$ , es esta fase la fuente más importante de nutrientes para ser absorbida por las raíces (Howard, 1987).

#### **6.2.2.1. PROCESO DE ABSORCIÓN DE NUTRIENTES DEL SUELO**

Al ser el suelo, una fuente natural de nutrientes, pero en su mayor parte en forma no disponible para las plantas, son imprescindibles algunos procesos para hacerlos disponibles, los procesos son la descomposición biológica de la materia orgánica (mineralización), procesos físicos y reacciones químicas (intemperismo de desintegración y descomposición) y extracción de las partículas del suelo; interacción con las raíces de la planta y la solución del suelo (Salamanca y Baquero, 2006). La absorción de elementos nutritivos se efectúa por medio de los pelos radiculares de las raíces jóvenes, que segregan sustancias ácidas que ayudan a solubilizar los nutrientes; se lleva a cabo en dos fases, la primera pasiva, movilizándose los iones en el suelo hasta llegar a las raíces, por flujo masivo, siguiendo en disolución el movimiento del agua, en forma ascendente y descendente y por difusión, generado para equilibrar la concentración de un ión determinado, en todo el volumen de la solución del suelo, la segunda fase, activa, ya estando los iones en contacto con la raíz, son atrapados por un transportador químico (proteínas transportadoras), que permiten superar la barrera de la epidermis radicular; este proceso implica consumo de ATP y  $\text{O}_2$  (García-Serrano et al, 2009).

### **6.2.3. PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO DE LAS CANTIDADES DE NUTRIENTES REQUERIDAS POR UN CULTIVO.**

No todas las especies de plantas tienen los mismos requerimientos cuantitativos de nutrientes (Universidad de Buenos Aires, 2008). Dependiendo de los requerimientos de las especies, se pueden establecer planes de fertilización que permitan suplir sus necesidades nutricionales. Con el fin de proponer el programa de fertilización más adecuado, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. Un análisis químico del suelo en el que se sembraran las plantas, que permita determinar cuál es la disponibilidad de los elementos esenciales para la nutrición mineral.
2. Conociendo el requerimiento de nutrientes del cultivo a fertilizar, calcular el peso de una hectárea de suelo, con base en la densidad aparente, que es una medida usada para convertir valores expresados en concentraciones, a unidades de masa o volumen, cálculos muy usados en fertilización.
3. Teniendo los resultados del análisis de suelo, realizar la conversión de los nutrientes dependiendo de si se está teniendo en cuenta el área de cultivo o el peso del sustrato.
4. Determinar las cantidades de nutrientes a aplicar, es decir, la diferencia entre los requerimientos de la especie y los nutrientes disponibles en el suelo; con ello se corrigen las deficiencias y se ajustan los desbalances entre los nutrientes (Barrera et al, 2010).
5. Seleccionar el tipo de fertilizante a usar y calcular la cantidad a aplicar. Debe tenerse en cuenta la eficiencia del uso de nutrientes de los fertilizantes por la planta, la aplicación y la concentración de nutrientes en cada fórmula del fertilizante (Barrera et al, 2010).

### **6.3. METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS**

Mediante el metabolismo secundario, las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos que no tienen una función directa sobre su desarrollo, contrario a los compuestos sintetizados mediante el metabolismo primario (aminoácidos, azúcares, lípidos y nucleótidos). Los metabolitos secundarios se han dividido en tres grandes grupos químicos: Terpenos, Fenoles y Alcaloides, los cuales son formados por moléculas precursoras también utilizadas para la formación de algunos compuestos pertenecientes al metabolismo primario y por las rutas metabólicas específicas del ácido siquímico, acetato-malato y acetato-mevalonato. Recientes estudios han sugerido que estos compuestos tienen una importancia funcional ecológica en plantas como protectores frente a la herbivoría, microorganismos fitopatógenos, así como agentes para la atracción de polinizadores y dispersores de semillas, también como sustancias útiles en fenómenos alelopáticos o de competencia planta-planta (Taiz y Zeiger, 1998). Contrario a los metabolitos primarios, estos compuestos tienen una distribución restringida en el reino vegetal, es decir son encontrados en un grupo taxonómico particular como especie, género o familia o grupos estrechamente relacionados de familias. El metabolismo secundario vegetal es una fuente importante de ingredientes activos de medicamentos y otros productos valiosos para la industria (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

### **6.4. GENERALIDADES SOBRE LOS ALCALOIDES**

Los alcaloides son un grupo de compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas, que contienen en su molécula un átomo de nitrógeno, que hace parte de un anillo heterocíclico, como su nombre lo indica (parecido al álcali), son compuestos básicos y se forman por rutas biosintéticas diversas a partir de ciertos aminoácidos comunes como la L-ornitina, L-arginina, L-lisina, L-fenilalanina, L-tirosina o L-triptófano (Azcon-Bieto y Talon, 1993). Anteriormente se pensaba que los alcaloides eran desechos nitrogenados, análogos a la urea o ácido úrico en animales, también reguladores del crecimiento, pero hay poca evidencia que soporte estas

afirmaciones, actualmente se piensa que muchos alcaloides funcionan como sustancias útiles de defensa contra depredadores, especialmente los mamíferos, por su toxicidad general y capacidad disuasiva (Hartmann, 1992).

#### **6.4.1. DISTRIBUCIÓN DE ALCALOIDES EN EL REINO VEGETAL**

Las angiospermas son particularmente ricas en alcaloides, pero con distribución desigual. En monocotiledóneas estos compuestos se concentran principalmente en las familias Liliaceae y Amaryllidaceae (Dahlgren, 1980). Las dicotiledóneas son el grupo más representativo en riqueza de alcaloides, se destacan las familias Apocynaceae, Loganiaceae, Lauraceae, Rubiaceae, Solanaceae, Rutaceae y Fabaceae (Li y Willaman, 1968).

#### **6.4.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ALCALOIDES**

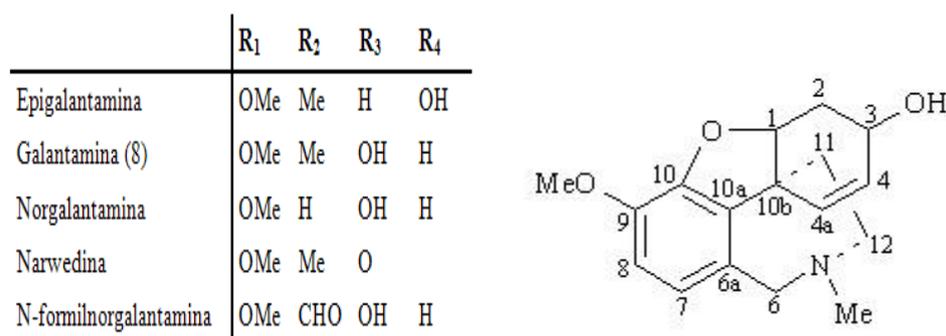
Casi todos los alcaloides son tóxicos para humanos y animales, cuando se ingieren en altas cantidades, como la atropina y la coniina (proveniente de los abetos). En bajas cantidades sin embargo, algunos compuestos son útiles a nivel farmacológico como la morfina y la codeína. Otros alcaloides, incluyendo la cocaína, nicotina y cafeína son usados ampliamente como estimulantes o sedantes de uso no médico. A nivel celular, su modo de acción es variable, unos actúan interfiriendo los componentes del sistema nervioso, como los neurotransmisores, otros afectan el transporte a nivel de membrana, la síntesis proteica o la actividad de las enzimas (Taiz y Zeiger, 1998).

#### **6.4.3. ALCALOIDES DEL TIPO GALANTAMINA**

Este grupo de compuestos, son representativos dentro de los alcaloides presentes en la familia de las Amarilidáceas, ya que tienen gran utilidad desde el punto de vista farmacológico debido a su actividad anticolinesterásica, siendo útil en el tratamiento de enfermedades que afectan al sistema nervioso central y periférico como la demencia tipo Alzheimer (Diop et al., 2007).

Los alcaloides tipo galantamina estructuralmente están constituidos por una agrupación compleja de 4 anillos, siendo el esqueleto dibenzofurano su estructura base y teniendo uno de los anillos saturados total o parcialmente. El átomo de nitrógeno puede ser secundario (en compuesto N-demetilados), terciario (como grupo N-metilo) o cuaternario (en algunos N-óxidos). Por lo general contienen un grupo hidroxilo no fenólico, un grupo metoxilo aromático y una insaturación entre las posiciones 4 y 4a. Los anillos ciclohexeno o en ocasiones ciclohexano y furano presentan una fusión cis. El número de alcaloides pertenecientes a esta estructura es reducido, siendo la mayoría derivados de la Galantamina, los cuales tienen distinto grado de oxidación, hidratación o sustitución (Cabezas, 2002), ver Figura 1.

**Figura 1.** Estructura básica de los alcaloides tipo Galantamina. Tomada de Cabezas (2002).



#### 6.4.4. DISTRIBUCIÓN DE ALCALOIDES EN LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE

En cuanto a la distribución de estos compuestos dentro de este grupo taxonómico, cabe mencionar que hasta el momento se han aislado 350 alcaloides estructuralmente diferentes, todos ellos en especies de la subfamilia Amaryllidoideae, mientras que las otras subfamilias parecen no contener este tipo de compuestos (Ghosal et al, 1985). En cuanto a la distribución de la Galantamina, en diferentes géneros de la familia Amaryllidaceae se resume en la siguiente tabla (ver Tabla 1):

**Tabla 1.** Presencia de la Galantamina en plantas de géneros pertenecientes a la familia Amaryllidaceae. Modificada de Cabezas (2002).

<b>Género</b>	<b>Tribu</b>
<i>Amaryllis</i>	Amaryllideae
<i>Chlidanthus</i>	-
<i>Cooperanthes</i>	-
<i>Crinum</i>	Amaryllideae
<i>Eustephia</i>	-
<i>Galanthus</i>	Galantheae
<i>Haemanthus</i>	Haemantheae
<i>Hippeastrum</i>	Hippeastreae
<i>Hymenocallis</i>	Eucharydeae
<i>Leucojum</i>	Galantheae
<i>Lycoris</i>	Lycorideae
<i>Narcissus</i>	Narcisseae
<i>Nerine</i>	Amaryllideae
<i>Pancratium</i>	Pancratieae
<i>Sternbergia</i>	Narcisseae
<i>Ungernia</i>	Lycorideae
<i>Zephyranthes</i>	Hippeastreae
<i>Eucharys</i>	-
<i>Caliphruria</i>	-
<i>Phaedranasa</i>	-

## 6.5. ANTECEDENTES

Existen registros en los que se reporta la incidencia de la fertilización, sobre la concentración de compuestos relacionados con el metabolismo secundario de las plantas:

Vyn et al, (1998) evaluaron el efecto del potasio como fertilizante en el contenido de Isoflavonas en soya (*Glycine max (L.) Merr*), este fertilizante fue suministrado antes y al momento de la cosecha, con aplicación superficial o en bandas a profundidad. Los resultados indicaron un incremento significativo en los contenidos tanto individuales, como totales de Isoflavonas, estimadas en

tratamientos con bandas a profundidad y sobre suelos con bajas concentraciones de potasio.

García y Ojeda, (2004) cuantificaron el contenido de flavonoides totales en hojas y tallos tiernos en plantas de cuatro variedades de *Morus alba*, utilizando 100, 300, 500 Kg de gallinaza como fuente de nitrógeno orgánico. En dos variedades de *Morus alba* el contenido de flavonoides en tallos tiernos mostró incremento ante el aumento de la dosis de fertilización nitrogenada orgánica, sin embargo, la concentración foliar no mostró aumentos significativos después de la aplicación de los fertilizantes.

Yaber Grass et al, (2005) hallaron variación en la producción de alcaloides pirrolizidínicos (APs.) en inflorescencias de *Senecio grisebachii* (arvense) causada por deficiencia de nitrógeno y fósforo. Estos datos confirmaron que el estrés nutricional por deficiencia de macronutrientes aumenta la producción de metabolitos secundarios, ya que la proporción de APs en inflorescencias de *S. grisebachii* se cuadruplicó cuando se redujo a la mitad, tanto la disponibilidad de nitrógeno como de fósforo.

Palumbo et al, (2006) evaluaron el efecto de la fertilización nitrogenada en la concentración de alcaloides tipo metilxantinas (cafeína y teobromina) en *Ilex vomitoria* (Aquifoliaceae). Después de la aplicación del fertilizante, nitrato de amonio (250 mg por semana repartidos equitativamente entre 23 plantas), durante tres meses, se encontró como resultado que aumentó entre cinco y diez veces la concentración foliar de estos alcaloides, en plantas fertilizadas frente a las plantas control.

Ru et al, (2011) determinaron la concentración de Galantamina en bulbos, hojas y raíces de *Lycoris aurea* (Amaryllidaceae), en respuesta a la aplicación de nitrógeno en condiciones de campo. Los resultados mostraron mayor cantidad de este alcaloide, en plantas a las que no se suministró nitrógeno, mientras que el suministro de altas cantidades de este elemento, ocasionó una

reducción en la síntesis de Galantamina, siendo en bulbos mayor la reducción que en raíces.

## 7. MARCO METODOLÓGICO

### 7.1. Área de estudio

El ensayo se llevó a cabo en el Jardín Botánico Álvaro José Negret, de la Universidad del Cauca, ubicado en la vereda La Rejoya, al noroccidente del municipio de Popayán (Cauca), entre los 2° 31' 23" Norte y 76° 35' 73" Oeste, a una altitud de 1800 m. La zona de ubicación del ensayo corresponde a un remanente boscoso de vegetación secundaria de 2,5 hectáreas (Bolaños et al., 2010).

**Figura 2.** Localización del Jardín Botánico Álvaro José Nrgret, lugar donde fueron establecidas en condiciones de sotobosque las plantas de *Caliphurria subedentata*, sometidas a tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

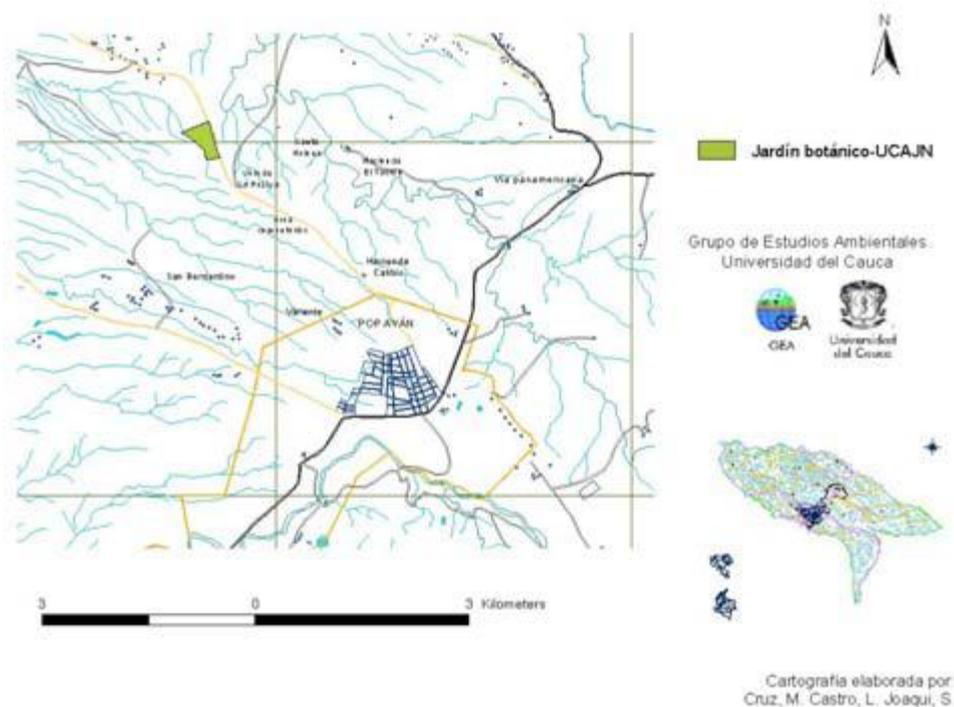


Imagen tomada de: Cruz et al. 2011.

## 7.2. Métodos

### 7.2.1. Análisis de suelo

Se realizó un análisis con el fin de determinar la composición química del suelo que se empleó como sustrato para el establecimiento de las plantas de *Caliphurria subedentata*, el que se utilizó como base para establecer las cantidades de macro y micronutrientes que fueron empleados como tratamientos en este trabajo de investigación. Una muestra de suelo colectada fue analizada en el Laboratorio CHEMILAB S.A.S, ubicado en la ciudad de Bogotá, siguiendo los protocolos definidos para tal caso. En las tablas 2 y 3 se pueden observar los resultados:

**Tabla 2.** Cantidad de macronutrientes presente en el suelo, empleado como sustrato para el establecimiento de plantas de *Caliphurria subedentata*, sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Ítem	Elemento	Unidad	Método analítico	Suelo 1 MS 3835
1	Calcio intercambiable	mg/kg ss	IGAC/SM 3111 B	500
2	Magnesio intercambiable	mg/kg ss	IGAC/SM 3111 B	22,29
3	Sodio intercambiable	mg/kg ss	IGAC/SM 3111 B	127
4	Potasio intercambiable	mg/kg ss	IGAC/SM 3500 K B	15,44

**Tabla 3.** Cantidad de micronutrientes presente en el suelo, empleado como sustrato para el establecimiento de plantas de *Caliphruria subedentata*, sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Ítem	Elemento	Unidad	Método analítico	Suelo 1 MS 4316
1	Cobre disponible	mg/kg ss	SM 3111 B	< 1,0
2	Hierro disponible	mg/kg ss	SM 3111 B	< 2,0
3	Manganeso disponible	mg/kg ss	SM 3111 B	1,10
4	Níquel disponible	mg/kg ss	SM 3111 B	< 1,0
5	Zinc disponible	mg/kg ss	SM 3111 B	0,517

El reporte indica que la textura del suelo es franco arenosa. En la tabla 2 se puede apreciar que el suelo contiene una gran cantidad de calcio intercambiable (500 mg/Kg ss) y sodio intercambiable (127 mg/Kg ss). La cantidad de magnesio y potasio (22.29 y 15.44 mg/Kg ss, respectivamente) es mucho menor. En cuanto a micronutrientes, en la tabla 2 se puede observar una mayor presencia de hierro (<2.0 mg/Kg ss) y manganeso (1.10 mg/Kg ss), así como una cantidad menor a 1 mg/Kg ss de cobre, níquel y zinc.

#### **7.2.1.1. Cantidad de nutrientes requeridos para el ensayo.**

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis de suelo, se realizó el cálculo de las cantidades de nutrientes a aplicar en el proceso de fertilización:

Para el caso específico de este ensayo y teniendo en cuenta el procedimiento para establecer los requerimientos nutricionales de un cultivo, se realizaron los cálculos de la siguiente manera:

- a. Debido a que se desconocen los requerimientos específicos de nutrientes para la especie *Caliphruria subedentata*, se tuvo en cuenta los requerimientos nutricionales de *Allium cepa* como base para realizar los

cálculos; esto debido a que ambas especies pertenecen a la familia Amaryllidaceae, por lo que podrían ser muy similares sus requerimientos nutricionales.

- b. Teniendo en cuenta que los requerimientos nutricionales de *Allium cepa* están dados en razón de un área, ya que se establecen para cultivos extensos, sus unidades se presentan en Kg/Ha. Como los análisis de suelo realizados para este ensayo fueron reportados en mg/Kg de suelo, y los bulbos serían plantados en un (1) kilogramo de suelo por bulbo, se realizó la conversión de unidades correspondiente, teniendo en cuenta el siguiente factor:

$$1 \text{ Ha} = 10000 \text{ m}^2 \times 0,20 \text{ m} = 2000 \text{ m}^3 \text{ (Volumen de suelo)}$$

$$2000 \text{ m}^3 \times \frac{1 \times 10^6 \text{ cm}^3}{1 \text{ m}^3} = 2 \times 10^9 \text{ cm}^3$$

$$\frac{0,92 \text{ g}}{\text{cm}^3} \times 2 \times 10^9 \text{ cm}^3 = 1,84 \times 10^9 \text{ g}$$

$$1 \text{ Ha} = 1,84 \times 10^9 \text{ g}$$

Dónde: 0,20 m es la profundidad del suelo (constante).

0,92 g/cm<sup>3</sup> es la densidad aparente determinada mediante el análisis de la muestra de suelo.

- c. Conociendo los resultados del análisis de suelo y los requerimientos nutricionales de una especie vegetal (en este caso *Allium cepa*), se calculó la cantidad de cada nutriente que se necesita aplicar para suplir cualquier deficiencia, para lo que se empleó la siguiente ecuación:

$$N = R - D$$

Dónde: N= Cantidad de nutriente que necesita suministrar para suplir la deficiencia en el requerimiento nutricional (en mg/Kg de suelo).

R= Requerimiento del nutriente por la especie (en mg/Kg de suelo).

D= Disponibilidad del nutriente en el suelo (en mg/Kg de suelo).

- d. Los nutrientes no se encuentran en estado puro, si no combinados con otros elementos, por lo que es necesario tener en cuenta la pureza del compuesto que se emplea como fuente de un elemento así como la eficiencia, que es la proporción de nutriente que es aprovechado por la especie o cultivo y que generalmente se expresa en un porcentaje (Barrera et al, 2010) Los nutrientes utilizados en este ensayo fueron los siguientes:

**Tabla 4.** Porcentaje de pureza y de eficiencia correspondiente a diferentes elementos minerales, aplicados a plantas de *Caliphurria subedentata* como tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Nutriente	Fórmula	Pureza (%)	Eficiencia (%)
Nitrógeno	NPK	-	-
Fósforo	NPK	-	-
Potasio	NPK	-	-
Zinc	ZnSO <sub>4</sub> – 4H <sub>2</sub> O	99	10
Boro	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	99	25
Cobre	CuSO <sub>4</sub> – 5H <sub>2</sub> O	99	7
Manganeso	MnSO <sub>4</sub> – H <sub>2</sub> O	99	5
Hierro	FeSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	99	8

- e. Según lo anterior, las cantidades aplicadas de cada elemento en el ensayo, fueron las siguientes:

**Tabla 5.** Cantidad de diferentes elementos minerales suministrada a plantas de *Caliphurria subedentata*, a manera de tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Nutriente	Cantidad contenida en el suelo	Cantidad requerida por la planta	Cantidad a aplicar
Nitrógeno	-	0,11 g/Kg ss	0,09 g/Kg ss
Fósforo	-	3,50 mg/Kg ss	0,9 g/Kg ss
Potasio	1.86x10 <sup>-5</sup> Kg/Kg ss	3.04x10 <sup>-5</sup> Kg/Kg ss	1.18x10 <sup>-5</sup> Kg/Kg ss
Zinc	0.517 mg/Kg ss	1.08 mg/Kg ss	0.0020 g/Kg ss
Boro	-	15.06 mg/Kg ss	0.01506 g/Kg ss
Cobre	<1.0 mg/Kg ss	13.56 mg/Kg ss	0.014 g/Kg ss
Manganeso	1.10 mg/Kg ss	3.00 mg/Kg ss	0.118 g/Kg ss
Hierro	<2.0 mg/Kg ss	37.5 mg/Kg ss	0.20 g/Kg ss

### **7.2.2. Establecimiento del ensayo**

Las plantas de *Caliphruria subedentata* fueron obtenidas a partir de bulbos provenientes de la Colección de Plantas de la Familia Amaryllidaceae, localizada en Jardín Botánico Álvaro José Negret de la Universidad del Cauca, los cuales se sembraron en materas plásticas que contenían un (1) kg de suelo, y fueron colocados durante el transcurso del ensayo en un área boscosa. El tratamiento consistente en macronutrientes fue aplicado al suelo una vez iniciada la emergencia de la primera hoja, en tanto que el tratamiento con micronutrientes se aplicó foliarmente y en la base del peciolo, una vez desarrollada y expandida la primera hoja.

### **7.2.3. Etapa de seguimiento del ensayo**

El seguimiento del ensayo se realizó mediante una observación dos veces a la semana durante siete (7) meses, periodo durante el que se efectuaron las labores necesarias para el mantenimiento de las condiciones adecuadas para el crecimiento de las plantas de *Caliphruria subedentata*.

### **7.2.4. Variables a considerar en el estudio**

Las variables consideradas fueron las siguientes: Peso fresco y seco de hojas, bulbos y raíces, altura de la planta, número de hojas y de bulbos por planta, área foliar, tiempo de aparición de hojas y flores y contenido de Galantamina en bulbos y hojas.

### **7.2.5. Medición de Variables**

Finalizado el período de seguimiento, se colectó el material vegetal para la respectiva medición de variables. Mediante conteo realizado en campo, se determinó el número de bulbos y el número de hojas producidas. La altura de la planta se obtuvo mediante el uso de una cinta métrica, tomando la medida desde la base de la planta, hasta el punto más alto alcanzado por la misma.

Con balanza de precisión, se determinó el peso fresco de bulbos, hojas y raíces. El área foliar, se midió en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en el municipio de Palmira (Valle), empleando un Medidor de Área Foliar LI-COR LI-3100. Posteriormente tanto los bulbos, como las hojas y raíces fueron sometidos a un proceso de secado a 30°C, utilizando un horno Memmert Typ UM 400, proveído por el Laboratorio de Docencia del Departamento de Biología, de la Universidad del Cauca, para finalmente cuantificar el peso seco de estas estructuras. El tiempo de aparición de hojas y flores, se estableció mediante observación directa realizada durante el periodo de seguimiento.

En cuanto a la cuantificación de Galantamina, para la preparación de las muestras, se pesó una fracción de cada extracto sólido y se reconstituyó en la fase móvil, que fue acetonitrilo grado HPLC. El extracto obtenido se filtró y luego se tomó una alícuota para su respectiva dilución. Posteriormente, se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD).

El método fue estandarizado en el Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), ubicado en las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Como material de referencia se utilizó la Galantamina suministrada por el Grupo de Química de Compuestos Bioactivos (QCB) de la Universidad del Cauca. El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido (LC) *Agilent Technologies 1200 series* (Palo Alto, California, EE.UU) con detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD), a una longitud de onda de 260 nm. La columna empleada en el análisis fue ZORBAX (C18) (AT), 250 mm x 4.6 mm (d.i.) x 5 µm (tamaño de partícula). La inyección se realizó en modo automático ( $V_{iny} = 60 \mu\text{L}$ ) con gradiente de elución isocrático, a un flujo de 1 mL/min y temperatura de 30 °C.

### **7.2.6. Descripción fenológica de plantas de *Caliphruria subedentata* Baker, cultivadas en condiciones de sotobosque.**

Dos etapas fenológicas de *Caliphruria subedentata* Baker fueron observadas, durante el período de seguimiento, equivalente a seis meses: etapa vegetativa y etapa reproductiva. Las características fenológicas consideradas en este estudio fueron: Con relación a la etapa vegetativa número de hojas por planta, ancho y longitud inicial y final de la hoja; y con respecto a la etapa reproductiva número de flores y frutos por planta, longitud del escapo y tiempo transcurrido a floración y fructificación.

#### **7.2.6.1. Descripción de las etapas fenológicas:**

Con el propósito de caracterizar cada etapa fenológica de esta especie, se observaron 12 plantas obtenidas a partir de bulbos establecidos en sustrato no suplementado con fertilización; además en un número igual de plantas establecidas en sustrato suplementado con macro y micronutrientes.

### **7.2.7. Tratamientos, Diseño Experimental y Análisis Estadístico de Datos**

Los tratamientos que se aplicaron en este experimento fueron: un testigo absoluto, para el que se empleó suelo proveniente de un lote, en el cual nunca se realizaron manejos agronómicos; un segundo tratamiento consistente en una fuente comercial de nitrógeno, fósforo y potasio (15-15-15), la cual se incorporó al suelo; un tercer tratamiento consistente en una solución nutritiva elaborada a base de B, Cu, Fe, Mn y Zn, que se aplicó foliarmente y en la base de la parte aérea de planta que hace contacto con el sustrato; finalmente un cuarto tratamiento que consistió en la combinación de los macro y micronutrientes mencionados.

Los tratamientos se aplicaron a las unidades experimentales mediante un diseño completamente aleatorio, asignándose a cada tratamiento 16 unidades experimentales. Los datos registrados se procesaron con el programa BioStat 5.3.0, primero, aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnoff con el objetivo de comprobar si los datos se ajustaban a la distribución normal. Para las variables

que se ajustaron y presentaron homogeneidad de varianzas, como área foliar, altura de la planta, peso fresco y seco de hojas, peso seco de bulbos, peso fresco de raíces y tiempo de crecimiento se aplicó ANOVA de una vía. Cuando las varianzas no eran homogéneas como en las variables peso fresco de bulbos y peso seco de raíces, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Cuando existieron o se establecieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) se realizó una prueba de contrastes múltiples como la Prueba de Dunnett para comparar los tratamientos con el testigo absoluto, o la Prueba de Tukey para comparar los tratamientos entre sí.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 8.1. Análisis de Variables de Crecimiento.

#### 8.1.1. Área Foliar, Altura de la Planta, Tiempo de Crecimiento.

Durante y después del proceso de fertilización, se colectaron datos que permitieron hacer un análisis de las variables de crecimiento: área foliar, altura de la planta y tiempo de crecimiento (Tabla 6 y 7).

**Tabla 6.** Análisis estadístico de las variables área foliar y altura estimadas en plantas de *Caliphuria subdentata*, sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Tratamiento	Área Foliar (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	Altura (cm planta <sup>-1</sup> )
Testigo	27,47 ± 14,68 <sup>A</sup>	15,75 ± 3,84 <sup>A</sup>
Macronutrientes	26,14 ± 14,72 <sup>A</sup>	15,66 ± 3,94 <sup>A</sup>
Micronutrientes	30,59 ± 13,47 <sup>A</sup>	17,28 ± 3,50 <sup>A</sup>
Macronutrientes + Micronutrientes	21,99 ± 10,46 <sup>A</sup>	15,01 ± 2,55 <sup>A</sup>

Nota: Datos presentados como Media ± Desviación estándar. Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

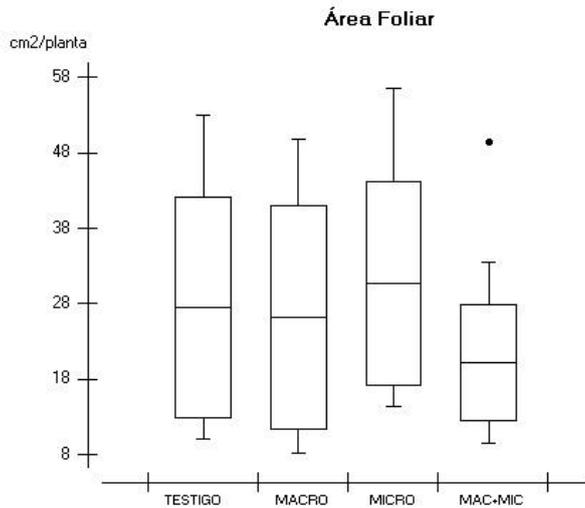
**Tabla 7.** Análisis estadístico de la variable tiempo de crecimiento requerido para alcanzar el ancho, la longitud de la lámina foliar y longitud total de la segunda hoja desarrollada en plantas de *Caliphurria subedentata*, sometidas a tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Tiempo transcurrido hasta el desarrollo completo (En días)			
Tratamientos	Ancho de la segunda hoja	Longitud de la lámina de la segunda hoja	Longitud total de la segunda hoja
Testigo	39,30 ± 5,38 <sup>A</sup>	41,80 ± 7,47 <sup>A</sup>	47,60 ± 6,28 <sup>A</sup>
Macronutrientes	32,08 ± 5,74 <sup>B</sup>	38,92 ± 7,95 <sup>A</sup>	41,08 ± 8,99 <sup>A</sup>
Micronutrientes	39,00 ± 5,13 <sup>A</sup>	41,69 ± 6,43 <sup>A</sup>	46,06 ± 6,38 <sup>A</sup>
Macronutrientes+ Micronutrientes	31,57 ± 9,53 <sup>C</sup>	34,43 ± 9,15 <sup>A</sup>	42,00 ± 6,54 <sup>A</sup>

Nota: Datos presentados como Media ± Desviación estándar. Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

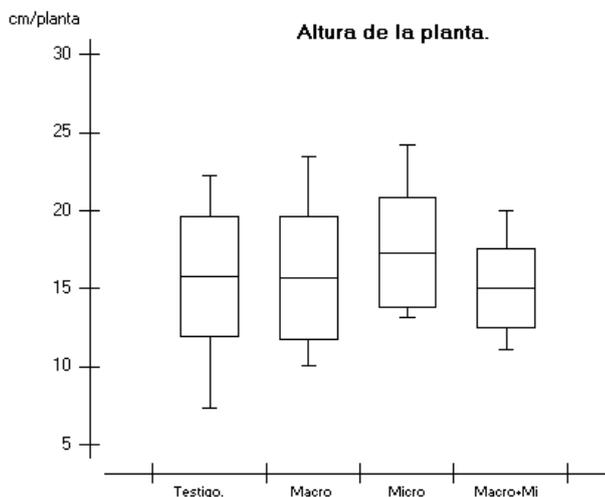
En cuanto al crecimiento de las plantas, representado en las variables área foliar y altura máxima, no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Tabla 6). Sin embargo vale la pena resaltar que el valor máximo para ambas variables se presentó en el tratamiento con micronutrientes, en tanto que el valor mínimo se observó en el tratamiento constituido por la combinación de macro y micronutrientes (Figuras 3 y 4). Aunque los cálculos para la aplicación de fertilizantes en las plantas de *Caliphurria subedentata* fueron realizados con base al cultivo de cebolla (*Allium cepa*), debido a su cercanía taxonómica, es sabido que las respuestas de las plantas a los diferentes elementos esenciales suministrados mediante fertilizantes dependen de la especie, así como de otros factores (Añez et.al 1986).

**Figura 3.** Área foliar promedio estimada en plantas de *Caliphurria subedentata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.



Nota: MACRO corresponde al tratamiento con macronutrientes, MICRO corresponde al tratamiento con micronutrientes y MAC-MIC corresponde al tratamiento de la combinación de macronutrientes y micronutrientes.

**Figura 4.** Altura promedio alcanzada en plantas de *Caliphurria subedentata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.



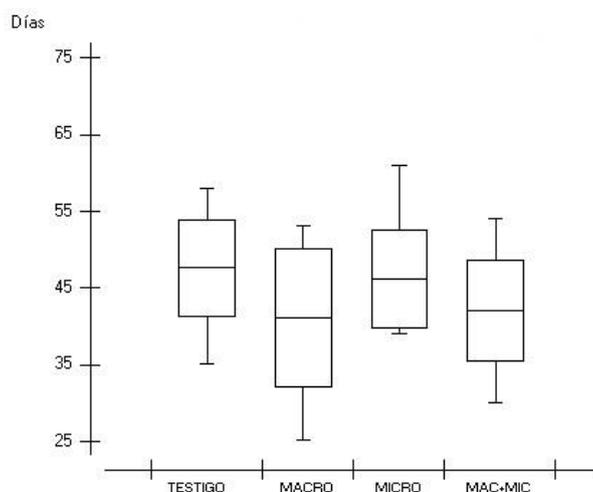
Nota: Macro corresponde al tratamiento con macronutrientes, Micro corresponde al tratamiento con micronutrientes y Macro-Mic corresponde al tratamiento de la combinación de macronutrientes y micronutrientes.

El tiempo de crecimiento de las plantas del ensayo fue medido desde la aparición de la segunda hoja, ya que los tratamientos fueron aplicados cuando

en todas las plantas se había desarrollado la primera hoja, por lo que el crecimiento de esta primera hoja no fue influido por los mismos (Tabla 7). El ancho de la hoja fue medido con una cinta métrica, de lado a lado de la hoja; la longitud de la lámina foliar fue medida desde el ápice de la segunda hoja hasta su base; la longitud total fue medida desde el ápice de la segunda hoja hasta la base de la planta, tomando en cuenta la lámina y el peciolo.

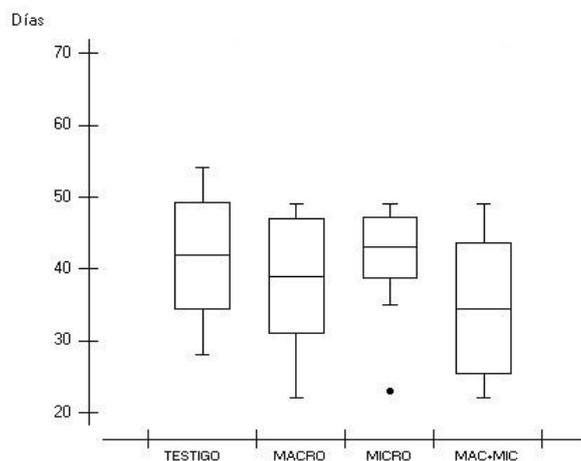
Las diferencias en el tiempo en que se alcanzó la longitud laminar promedio de la segunda hoja y la longitud total de la segunda hoja no fueron estadísticamente significativas (Tabla 7); sin embargo cabe resaltar que respecto a la variable longitud de la segunda hoja, las plantas a las que se aplicó el tratamiento compuesto por la combinación de macronutrientes y micronutrientes alcanzaron el valor promedio en menor tiempo, en tanto que con relación a la longitud total de la segunda hoja, las plantas del tratamiento con macronutrientes alcanzaron el valor promedio en un tiempo menor (Figuras 5 y 6). El número de días requeridos para alcanzar el valor promedio de estas variables en el testigo y el tratamiento con micronutrientes fue estadísticamente el mismo.

**Figura 5.** Tiempo necesario para alcanzar la longitud total máxima en la segunda hoja desarrollada en plantas de *Caliphurria subedentata* fertilizadas con macro y micronutrientes.



Nota: Tiempo estimado en días después de la siembra. MACRO corresponde al tratamiento con macronutrientes, MICRO corresponde al tratamiento con micronutrientes y MAC-MIC corresponde al tratamiento de la combinación de macronutrientes y micronutrientes.

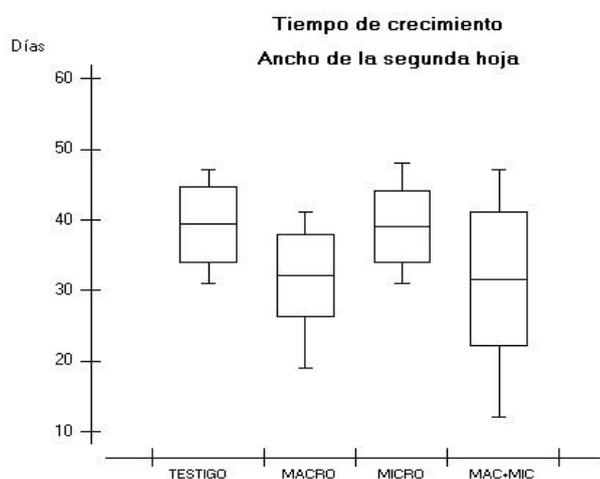
**Figura 6.** Tiempo requerido para alcanzar la longitud máxima promedio en la lámina de la segunda hoja desarrollada en plantas de *Caliphurria subedentata*, fertilizadas con macro y micronutrientes.



Nota: Tiempo estimado en días después de la siembra. MACRO corresponde al tratamiento con macronutrientes, MICRO corresponde al tratamiento con micronutrientes y MAC-MIC corresponde al tratamiento de la combinación de macronutrientes y micronutrientes.

Como se puede apreciar en la tabla 7, con relación al tiempo en el que se alcanzó el valor promedio del ancho de la segunda hoja, existen diferencias estadísticamente significativas entre el testigo absoluto y los dos (2) tratamientos en los que se suministró macronutrientes; lo que indica que en estos dos tratamientos el tiempo transcurrido para alcanzar el valor promedio de esta variable fue menor respecto al transcurrido para el testigo absoluto y el tratamiento con micronutrientes (Figura 7).

**Figura 7.** Tiempo requerido para alcanzar el ancho máximo promedio en la segunda hoja desarrollada en plantas de *Caliphurria subedentata* fertilizadas con macro y micronutrientes.



Nota: Tiempo estimado en días después de la siembra. MACRO corresponde al tratamiento con macronutrientes, MICRO corresponde al tratamiento con micronutrientes y MAC-MIC corresponde al tratamiento de la combinación de macronutrientes y micronutrientes.

Según estos resultados, parece ser que el crecimiento de las plantas de *Caliphurria subedentata* fertilizadas con macronutrientes pudo haberse acelerado, pero así mismo, también parece detenerse rápidamente, alcanzando un valor promedio menor que en las plantas de los demás tratamientos. Así, el tiempo de crecimiento es una variable que podría verse afectada por la disponibilidad de nutrientes.

Entre los resultados obtenidos del tiempo de crecimiento acelerado en los tratamientos con macronutrientes y los anteriores de área foliar y altura, en los que el tratamiento con micronutrientes produjo los valores medios más altos respecto a los demás tratamientos y el tratamiento con macronutrientes produjo valores medios similares o incluso más bajos que los del testigo absoluto, podría existir una concordancia. Esto debido a que el menor tiempo de crecimiento de las plantas fertilizadas con macronutrientes puede explicar la tendencia de los valores medios en las variables área foliar y altura a ser más bajos. En este sentido, Ru et.al, (2011) realizaron un estudio en el que evaluaron el efecto de la aplicación de nitrógeno sobre las propiedades fisiológicas y proteómicas de *Lycoris aurea*, con el fin de explorar los factores que influyen en la biosíntesis de galantamina. Un aumento marcado del

crecimiento se observó en plantas bajo condiciones de ausencia de nitrógeno, mientras se observó una disminución en el crecimiento bajo condiciones de alto suministro de nitrógeno. En la presente investigación, a pesar que no hubo ningún tratamiento con ausencia total de nitrógeno o de cualquier otro elemento, es posible que un nivel elevado de nitrógeno en el tratamiento con macronutrientes haya producido la misma respuesta en las plantas de *Caliphurria subedentata* que en las plantas de *Lycoris aurea*. Además, un óptimo nivel de nitrógeno y el efecto de la fertilización en el tratamiento con micronutrientes puede explicar el aumento del crecimiento de las plantas de *Caliphurria subedentata* en este tratamiento.

Es un hecho conocido que un exceso de fertilización con nitrógeno puede producir efectos adversos en el crecimiento y en el estado fisiológico de las plantas. En la mayoría de cultivos, el aumento del rendimiento con el suministro de nitrógeno llega hasta un valor máximo, seguido por una disminución del rendimiento a valores de nitrógeno muy altos (Universidad de Buenos Aires, 2008). El exceso de nitrógeno causa una reducción significativa en la intensidad de la fotosíntesis (asimilación de carbono) y la transpiración en plantas (Stera y Ctepa, 2012). De acuerdo con Mejía (2010) y Oliet et.al (1996), cuando el suministro de nitrógeno es excesivo, la parte aérea de la planta tiende a crecer más con respecto al crecimiento de las raíces, modificando su relación parte aérea/parte subterránea, lo que es desfavorable para la obtención de nutrientes y agua. La fertilización excesiva en el Olivo (*Olea europaea*) puede causar reducción del crecimiento y toxicidad (Trojanos y Roukounaki, 2011). Cantidades excesivas de nitrógeno en la fertilización en *Beta vulgaris* disminuyen el rendimiento, afectan la resistencia de las plantas a las condiciones climáticas (sequía, viento) o patógenos y acortan el período de almacenamiento (Dzida et.al, 2012).

Una forma de explicar que el exceso de nitrógeno retarde el crecimiento e interfiera en el estado fisiológico de la planta, es por medio de su interacción en la absorción normal de otros nutrientes. La aplicación excesiva de nitrógeno puede traer como consecuencia una deficiencia de zinc (Khan et.al, 2012;

Mejía, 2010). El zinc es importante por su capacidad para influir en los niveles de auxina y durante mucho tiempo ha sido conocido por actuar como coenzima en la producción de triptófano, precursor de la formación de la auxina (Ahmad et.al, 2011; Khan, 2012), lo que conlleva a un mayor crecimiento de las plantas en su parte aérea. En los tratamientos enriquecidos con macronutrientes, por tanto, una de las maneras en las que el nitrógeno posiblemente pudo influir en el crecimiento de las plantas de *Caliphurria subedentata* fue actuando negativamente sobre la absorción de zinc.

De forma contraria, posiblemente el nitrógeno no interfirió en la absorción del zinc en plantas de *Caliphurria subedentata* fertilizadas con micronutrientes. Por tanto, es posible que la tendencia de los valores medios más altos de área foliar y altura de plantas en el tratamiento con micronutrientes, así como una tendencia a un mayor tiempo de crecimiento del ancho de la hoja respecto a los tratamientos suplementados con macronutrientes, se deba a una absorción adecuada de zinc. La aplicación foliar de este elemento, también pudo favorecer su absorción y por tanto, alcanzar un nivel óptimo del mismo en el tratamiento con micronutrientes, ya que este tipo de aplicación tiene una serie de ventajas frente a la aplicación directa al suelo, como su alta eficacia, la rápida respuesta de la planta y la eliminación de los síntomas de toxicidad provocada por la acumulación excesiva en el suelo de este nutriente y de otros como el cobre, manganeso, hierro y boro (Khan, 2012). En este ensayo es posible que también se haya conseguido un nivel óptimo de fertilización con estos micronutrientes.

En cuanto al efecto de los micronutrientes en el desarrollo vegetal, se sabe que el boro juega un papel importante en el crecimiento de tallos y raíces (Khan, 2012; Mejía 2010), ya que está implicado en una serie de funciones en la planta, entre las que destacan el metabolismo de los azúcares, el aumento de la tasa de respiración, la regulación de absorción de agua por la célula, el metabolismo del nitrógeno, la síntesis de la pared celular, entre otras (Ahmad, 2011; Mejía, 2010). Ya que la deficiencia de boro se presenta principalmente en suelos arenosos (Khan, 2012), como en el caso del suelo franco arenoso

utilizado para este ensayo, es posible que su aplicación foliar en el tratamiento con micronutrientes tenga influencia en el aumento de crecimiento de tallos y raíces ocasionado por este tratamiento respecto al testigo absoluto.

El hierro es importante en el crecimiento y la producción en plantas y su principal función se relaciona con la activación de enzimas; además interviene en las reacciones fundamentales de óxido-reducción y la fotosíntesis, entre otros procesos (Barrera et.al, 2010, Mejía, 2010). El hierro también podría intervenir en la elongación de la raíz, pues su deficiencia causa una alteración negativa en este proceso (Cohelo et.al, 2011).

Una de las funciones principales del manganeso en el crecimiento es su participación en la multiplicación celular, además del rompimiento de la molécula del agua en la fotosíntesis y su participación en la activación de enzimas para la fijación de nitrógeno (Mejía, 2010).

El cobre es un micronutriente esencial para el metabolismo de hidratos de carbono y nitrógeno; también para la síntesis de lignina que se necesita para la resistencia de la pared celular y la prevención de marchitamiento (Ahmad et al., 2011), por tanto, está implicado en el buen desarrollo y rendimiento de los cultivos (Mejía, 2010).

La absorción de los micronutrientes en este ensayo además pudo verse favorecida porque los tratamientos de fertilización con estos elementos posiblemente contenían ya una cantidad apropiada de fósforo, condición en la que se estimula el desarrollo de la raíz y se favorece así la absorción de otros nutrientes (Saraiva et al., 2011).

### **8.1.2. Número de Hojas y de Bulbos.**

Las variables número de hojas y número de bulbos no fueron analizadas estadísticamente, debido a que los datos no presentaron a simple vista variabilidad que justificara la realización de alguna prueba, que condujera a

establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas (Tablas 8 y 9). Vale la pena resaltar que en el tratamiento con micronutrientes se observó el mayor número de plantas en las que se desarrolló tres hojas como número máximo (Tabla 8).

**Tabla 8.** Número de hojas desarrolladas en plantas de *Caliphuria subedentata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Tratamiento	Unidades experimentales con una hoja producida	Unidades experimentales con dos hojas producidas	Unidades experimentales con tres hojas producidas	Número total de unidades experimentales
Testigo	1	13	2	16
Macronutrientes	0	14	2	16
Micronutrientes	0	10	6	16
Macronutrientes + Micronutrientes	1	12	3	16

La producción de bulbos secundarios fue muy reducida, presentándose solamente en dos de las unidades experimentales del testigo y en igual número del tratamiento con micronutrientes (Tabla 9). Cada bulbo en las dos unidades experimentales del tratamiento con micronutrientes produjo dos bulbos secundarios (Figura 8).

**Tabla 9.** Número de bulbos desarrollados en plantas de *Caliphurria subedentata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Tratamiento	Unidades experimentales sin.bulbos producidos	Unidades experimentales con un bulbo producido	Unidades experimentales con dos bulbos producidos	Número total de unidades experimentales
Testigo	14	2	0	16
Macronutrientes	16	0	0	16
Micronutrientes	14	0	2	16
Macronutrientes + Micronutrientes	16	0	0	16

**Figura 8.** Bulbos secundarios desarrollados en plantas de *Caliphurria subedentata* establecidas sin fertilización (testigo absoluto) y con fertilización de micronutrientes. El número del bulbo corresponde a la numeración asignada a las unidades experimentales.



Nota: El número del bulbo corresponde a la numeración asignada a la planta de la que provienen o unidad experimental.

### 8.1.3. Peso Fresco y Seco de Hojas, Bulbos y Raíces.

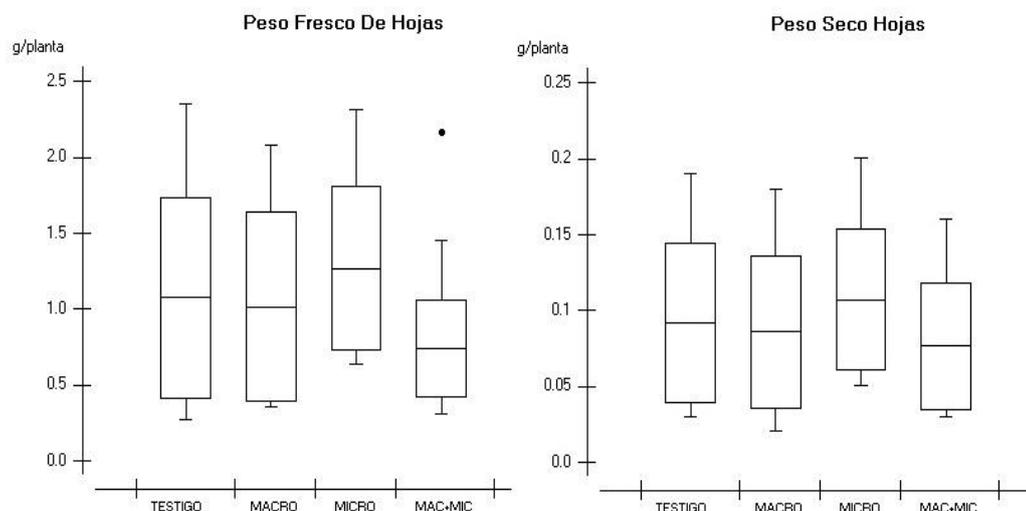
Los resultados de crecimiento respecto a las variables peso fresco y seco de hojas, bulbos y raíces se muestran en la Tabla 10. El peso fresco y seco de hojas y bulbos no presentó valores entre los que existieran diferencias estadísticas significativas, sin embargo se observó una tendencia similar a la anteriormente descrita para las demás variables; presentándose así la media con mayor valor en el tratamiento con micronutrientes, en tanto que la media con menor valor fue observada en los tratamientos en los que se encontraban presentes macronutrientes (Figuras 9 y 10).

**Tabla 10.** Análisis estadístico para las variables peso fresco y peso seco en hojas, bulbos y raíces de plantas de *Caliphurria subedentata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

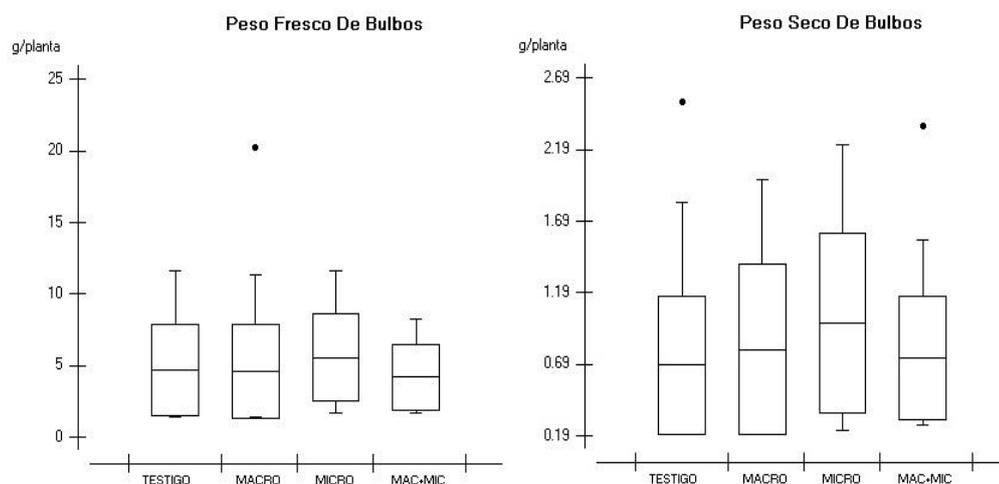
Tratamiento	Hojas		Bulbos		Raíces	
	PF (g)	PS (g)	PF (g)	PS (g)	PF (g)	PS (g)
Testigo	1,071 ± 0,664 <sup>A</sup>	0,091 ± 0,052 <sup>A</sup>	4,654 ± 3,170 <sup>A</sup>	0,795 ± 0,654 <sup>A</sup>	1,583 ± 1,076 <sup>A</sup>	0,096 ± 0,065 <sup>A</sup>
Macronutrientes	1,012 ± 0,625 <sup>A</sup>	0,086 ± 0,050 <sup>A</sup>	5,528 ± 5,024 <sup>A</sup>	0,790 ± 0,597 <sup>A</sup>	0,648 ± 0,693 <sup>B</sup>	0,055 ± 0,065 <sup>A</sup>
Micronutrientes	1,265 ± 0,540 <sup>A</sup>	0,107 ± 0,046 <sup>A</sup>	5,534 ± 3,042 <sup>A</sup>	0,973 ± 0,626 <sup>A</sup>	1,949 ± 1,126 <sup>A</sup>	0,130 ± 0,072 <sup>A</sup>
Macronutrientes + Micronutrientes	0,827 ± 0,469 <sup>A</sup>	0,076 ± 0,042 <sup>A</sup>	4,166 ± 2,317 <sup>A</sup>	0,829 ± 0,582 <sup>A</sup>	0,668 ± 0,650 <sup>C</sup>	0,041 ± 0,032 <sup>A</sup>

Nota: Valores presentados como Media ± Desviación estándar. Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas (p<0.05). PF=Peso Fresco, PS=Peso Seco.

**Figura 9.** Peso fresco y seco promedio en hojas de *Caliphurria subedentata* en los tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes aplicados.

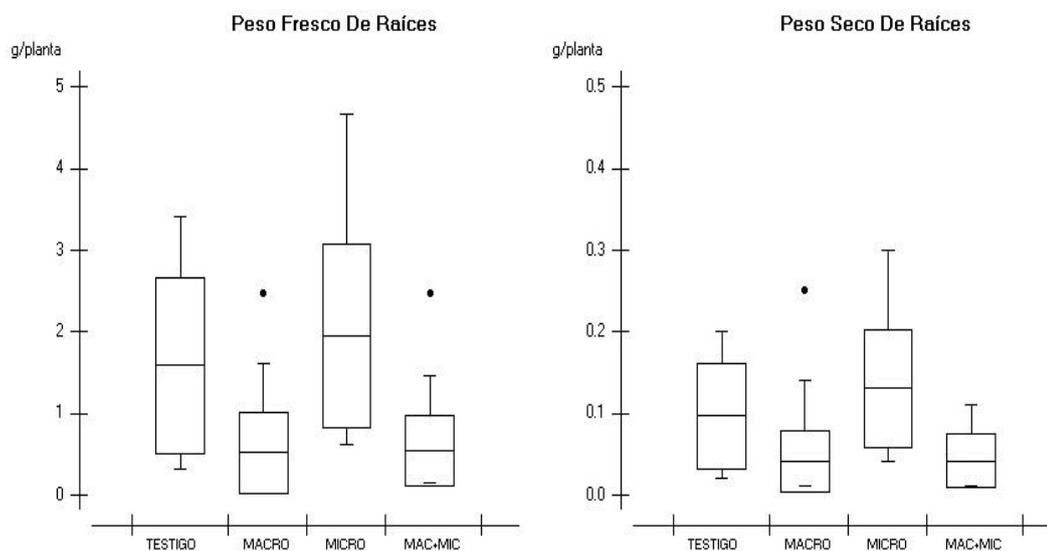


**Figura 10.** Peso fresco y seco promedio de bulbos de *Caliphurria subedentata* en los tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes aplicados.



La diferencia entre tratamientos respecto a la variable peso fresco de raíces resultó estadísticamente significativa (Tabla 10). Los tratamientos que presentan una diferencia significativa respecto al testigo absoluto son el tratamiento con macronutrientes y el tratamiento de la combinación de macronutrientes más micronutrientes (Tabla 10, Figura 11). Debido a que en el peso fresco no corresponde a una medida de la biomasa, pues el contenido en el peso fresco es en su mayoría agua, no es posible hacer inferencias sobre esta variable solamente teniendo estos datos.

**Figura 11.** Peso fresco y peso seco promedio en raíces de plantas de *Caliphuria subedentata* en los diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes aplicados.



El peso seco de raíces no presenta una diferencia significativa aplicando el test de Dunnet, que compara los tratamientos con el testigo absoluto (Tabla 10). Al efectuar la prueba de Tukey, que compara entre si los tratamientos y no con respecto al testigo, se evidencian diferencias significativas entre el tratamiento con micronutrientes y el tratamiento con macronutrientes, así como entre el tratamiento con micronutrientes y el tratamiento combinado de macronutrientes más micronutrientes. La prueba de Tukey fue aplicada para demostrar que el tratamiento con micronutrientes tiene valores significativamente más altos en el peso seco de raíces respecto a los tratamientos suplementados con macronutrientes (Figura 11). Como es sabido, una mejora en el sistema de raíces promueve la adquisición activa de agua y nutrientes para la producción de altos rendimientos y una mejora en la calidad de las plantas (Zhang et al, 2012). Un sistema radicular más desarrollado, a su vez, está afectado por muchos factores ambientales, incluyendo la nutrición mineral, lo que puede explicar las diferencias en el peso seco de las raíces entre las plantas sometidas al tratamiento con micronutrientes y los tratamientos suplementados con macronutrientes en este ensayo, indicando una adecuada fertilización en el tratamiento con micronutrientes.

Según Camargo (2006) y De Almeida et al (2012), es de esperarse que la asignación de biomasa hacia la raíz se dé si el nivel de los recursos de agua y nutrientes del suelo son bajos. Esta contradicción con los resultados obtenidos en esta investigación podría explicarse por el hecho de que una mayor asignación de biomasa en este órgano vegetal, estuvo condicionado en este ensayo por el posible efecto que tuvieron algunos elementos minerales, como el zinc o el hierro en el crecimiento de las raíces.

## 8.2. Análisis del Contenido de Galantamina en Hojas y Bulbos.

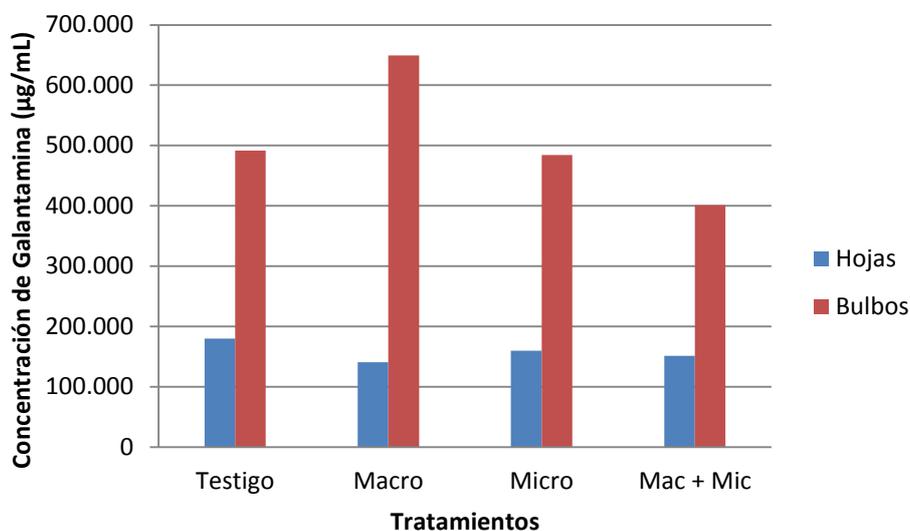
Los resultados obtenidos para la cuantificación de galantamina en hojas y bulbos de *Caliphruria subedentata* por HPLC/DAD se presentan en la Tabla 11. Puede observarse que en los bulbos de *Caliphruria subedentata* suplementados solamente con macronutrientes, la producción de galantamina fue mayor con respecto a los bulbos pertenecientes a los demás tratamientos, incluyendo el testigo (Figura 12). Así mismo puede observarse que esta alta producción de galantamina en los bulbos de *Caliphruria subedentata* suplementados únicamente con macronutrientes, se contrasta con una ligera disminución en la producción de galantamina en las hojas de las plantas de ese mismo tratamiento, con respecto al testigo y a los demás tratamientos (Tabla 11, Figura 12).

**Tabla 11.** Concentración de galantamina en hojas y bulbos de plantas de *Caliphruria subedentata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.

Tratamientos	Concentración de galantamina (µg/mL)	
	Hojas	Bulbos
Testigo	179.560	491.800
Macro	140.815	649.255
Micro	159.562	484.213
Macro + micro	151.258	401.110

Los resultados de concentración de galantamina están expresados para tres (3) gramos de materia seca en cada tratamiento.

**Figura 12.** Contenido de galantamina en hojas y bulbos de plantas de *Caliphruria subedentata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes.



Nota: Macro equivale a macronutrientes, Micro corresponde a micronutrientes y Mac + Mic corresponde al tratamiento de la combinación de macronutrientes y micronutrientes. La concentración está expresada con base a tres (3) gramos de materia seca en cada tratamiento.

En términos generales, se observó que el contenido de galantamina en plantas de *Caliphruria subedentata* está distribuido en mayor cantidad en bulbos que en hojas, en todos los tratamientos incluyendo el grupo testigo, lo que concuerda con lo reportado por Ru et al (2011) para *Lycoris aurea*, especie perteneciente a la familia Amaryllidaceae, en la que en general se obtuvo un nivel de galantamina más bajo en hojas respecto a bulbos y raíces. La mayor producción de galantamina en el tratamiento con macronutrientes, en comparación con los demás tratamientos, coincide con los resultados obtenidos por Lubbe et al. (2011), quienes al aplicar nitrógeno y potasio sobre bulbos de la especie *Narcissus pseudonarcissus*, perteneciente a la familia Amaryllidaceae, obtuvieron un incremento significativo en el contenido de galantamina, en comparación con un grupo de bulbos sin tratamientos de fertilización. De acuerdo con estos autores, que además de evaluar el efecto sobre el contenido de galantamina, también lo hicieron sobre el perfil metabólico de la especie, el nitrógeno disponible por la aplicación durante el ensayo en el tratamiento con macronutrientes, podría haber incrementado el

contenido de aminoácidos precursores de los alcaloides, entre ellos la tirosina, necesario para la síntesis de galantamina.

El contenido de galantamina en hojas resultó ser ligeramente menor en todos los tratamientos de fertilización, especialmente en el tratamiento con macronutrientes, con respecto al testigo (Tabla 11, Figura 12). Los resultados fueron similares a los obtenidos por Vasuki et al. (1980), quienes evaluaron el efecto de la aplicación de Zn, Fe, Cu y B en distintas combinaciones de cada elemento sobre el contenido de perivina (alcaloide indólico) en hojas, tallos y raíces de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Uno de los resultados sobre el porcentaje de acumulación de alcaloides en hojas para esta especie, reportó fueron menores frente al testigo, en este órgano, cuando los cuatro elementos mencionados hacían parte del tratamiento, mientras en los tallos eran mayores. Según los autores, en estas condiciones, el hierro y el cobre intervinieron en la activación enzimática necesaria para la biosíntesis de los precursores de los alcaloides indólicos como el triptófano, mientras el boro facilitó el transporte hacia los tallos de los fotoasimilados necesarios para cubrir las necesidades energéticas de esta vía metabólica, permitiendo mayor acumulación en tallos que en hojas. Basado en este indicio, en *Caliphurria subdentata*, el boro podría haber facilitado el transporte de los fotoasimilados, hacia los bulbos para la síntesis de galantamina, mientras la presencia de manganeso en el tratamiento con micronutrientes intervino en la activación enzimática para la biosíntesis de los precursores de esta vía metabólica, como la tirosina (Marschner, 1995).

### **8.3 Relación entre el crecimiento y el contenido de galantamina en las plantas fertilizadas.**

De acuerdo a la tabla 12 y al análisis estadístico (correlación de Pearson), la relación entre el crecimiento y el contenido de galantamina no es estadísticamente significativo ( $p \geq 0.05$ ).

**Tabla 12.** Análisis de correlación entre variables asociadas al crecimiento y el contenido de galantamina en hojas y bulbos de plantas de *Caliphurria subedentata*, fertilizadas con macro y micronutrientes.

	Altura	Área foliar	Tiempo crecimiento del ancho segunda hoja	Peso seco hojas	Peso seco bulbos
CGH	0,1915**	0,3643**	0,8218**	0,3317**	0.0298**
CGB	0,1036**	0,0291**	-0,1579	0,1271**	-0,3102**

Nota: Los datos corresponden al coeficiente de correlación de Pearson (R). CGH= contenido galantamina hojas, CGB= contenido galantamina bulbos. \*Significativo ( $p \leq 0.05$ ) y \*\*No significativo ( $p \geq 0.05$ ).

El análisis de correlación, indicó que no existe una relación de interdependencia entre las variables asociadas al crecimiento y el contenido de galantamina, tanto en bulbos como en hojas de plantas de *Caliphurria subedentata* fertilizadas con macro y micronutrientes.

#### **8.4. Descripción fenológica de plantas de *Caliphurria subedentata* Baker, cultivadas en condiciones de sotobosque.**

**8.4.1. Etapa Vegetativa:** Los datos de la tabla 13, indican que la etapa vegetativa (emergencia de la primera hoja) para las plantas no fertilizadas, inició en promedio a los 110 dds.

Durante el período de seguimiento, se formó una sola hoja por planta (Tabla 13). El inicio de esta fase se caracteriza por un rápido aumento de la longitud y el ancho de la lámina foliar, en un período corto de tiempo (Figura 13). Posteriormente, aparece el peciolo, el cual aumenta su longitud; la forma definitiva de la hoja comienza a ser visible y es cuando el crecimiento de la lámina foliar es lento, el cambio del color verde claro a una tonalidad más oscura, en el final de la etapa indica que la hoja ha alcanzado su madurez (Figura 14).

La morfometría de la hoja (Tabla 15), muestra que en el conjunto de plantas observadas, la lámina foliar alcanza una longitud promedio de 6.48 cm y un ancho promedio de 3.12 cm. Estos valores son menores, si se comparan con

los que corresponden a las plantas que recibieron alguno de los tratamientos con fertilización (Tabla 16).

Los datos de la tabla 14, indican que durante el período de seguimiento se observa que la mayoría de individuos tenían dos hojas, al finalizar el ensayo. Los datos también mostraron un alto porcentaje de individuos con mayor número de hojas (31.2%), al ser tratadas con micronutrientes. El tiempo promedio para la emergencia de la segunda y la tercera hoja es menor, 160 días y 204 días después de la siembra respectivamente, para el conjunto de plantas del mismo tratamiento. Promedios mayores de la longitud y el ancho alcanzados por la segunda hoja: 9.04 cm y 5.20 cm respectivamente (Tabla 16), también corresponden a las plantas que recibieron micronutrientes.

**Tabla 13.** Variables fenológicas estimadas en plantas de *Caliphuria subedentata*, desarrolladas sin fertilización en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca.

Planta	#hojas	Tiempo emergencia hoja (dds)	#Flores	Tiempo inicio floración (dds)	Longitud del escapo (cm)	#frutos	Tiempo inicio fructificación (dds)
1	1	76	-	-	-	-	-
2	1	68	-	-	-	-	-
3	1	76	-	-	-	-	-
4	1	76	-	-	-	-	-
5	1	64	-	-	-	-	-
6	1	174	-	-	-	-	-
7	1	174	-	-	-	-	-
8	1*	118	4	76	16.4	4	131
9	1*	118	5	82	30.4	5	124
10	1*	127	4	68	23.1	4	131
11	1*	127	5	61	27	-	-
12	1*	120	4	61	24	2	102
Promedio	1	109.83	4.4	69.6	24.18	3.75	122

\* Hoja producida posterior a la etapa de floración, dds= días después de la siembra.

**Tabla 14.** Variables fenológicas estimadas en plantas de *Caliphruria subedentata*, fertilizadas con macro y micronutrientes y desarrolladas en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico Universidad del Cauca.

Tratamiento	Etapa vegetativa %individuos 1h* 2h* 3h*	Tiempo emergencia dds 2h* 3h*	Floración %individuos	Tiempo floración dds	Nº flores	Longitud Escapo (cm)
Macronutr.	6,2 81,2 12,5	170 228	6,2	154	5	34
Micronutr.	- 68,7 31,2	160 204	-	-	-	-
Macronutr. + Micronutr.	6,2 75 18,7	167 223	-	-	-	-

1h\*= primera hoja, 2h\*= segunda hoja, 3h\*= tercera hoja, dds= días después de la siembra.

**Tabla 15.** Variables morfométricas estimadas en la primera hoja de plantas de *Caliphruria subedentata* desarrolladas sin fertilización, en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca.

Planta	Ancho inicial hoja (cm)	Ancho final hoja (cm)	Longitud inicial lámina foliar (cm)	Longitud final lámina foliar (cm)
1	0.6	4.2	1.2	8.1
2	0.7	5.1	1.0	8.5
3	0.8	2.9	1.3	6.2
4	0.9	2.2	1.2	6.9
5	0.6	3.5	1.6	7.6
6	1.6	2.6	2.6	6.0
7	0.8	2.7	1.7	6.1
8*	0.2*	0.4*	0.3*	0.3*
9	0.6	4.1	1.8	7.9
10	0.3	2.9	0.7	5.9
11	0.7	2.9	1.8	6.8
12	0.5	3.9	1.0	7.5
Promedio	0.69	3.12	1.35	6.48

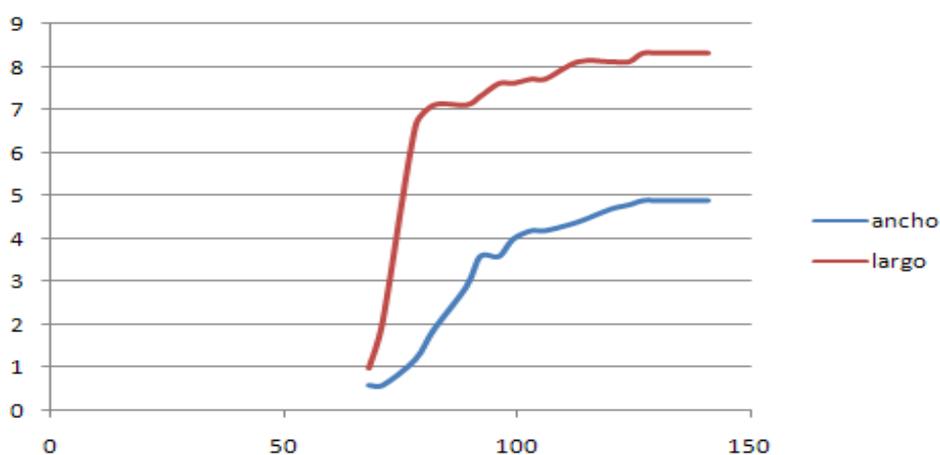
\* Planta que emergió, pero se marchitó en el proceso.

**Tabla 16.** Variables morfométricas estimadas en la segunda hoja de plantas de *Caliphruria subedentata*, fertilizadas con macro y micronutrientes y desarrolladas en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca.

Tratamiento	Ancho inicial hoja (cm)	Ancho final hoja (cm)	Longitud inicial lámina foliar (cm)	Longitud final lámina foliar (cm)
Macronutr.	0.46	4.32	1.26	7.97
Micronutr.	0.46	5.20	1.86	9.04
Macronutr. + Micronutr.	0.51	3.98	1.62	7.45

**Figura 13.** Representación gráfica del crecimiento en ancho y longitud de una hoja, observado en plantas de *Caliphruria subedentata* desarrolladas sin fertilización, y en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca.

Planta 2.

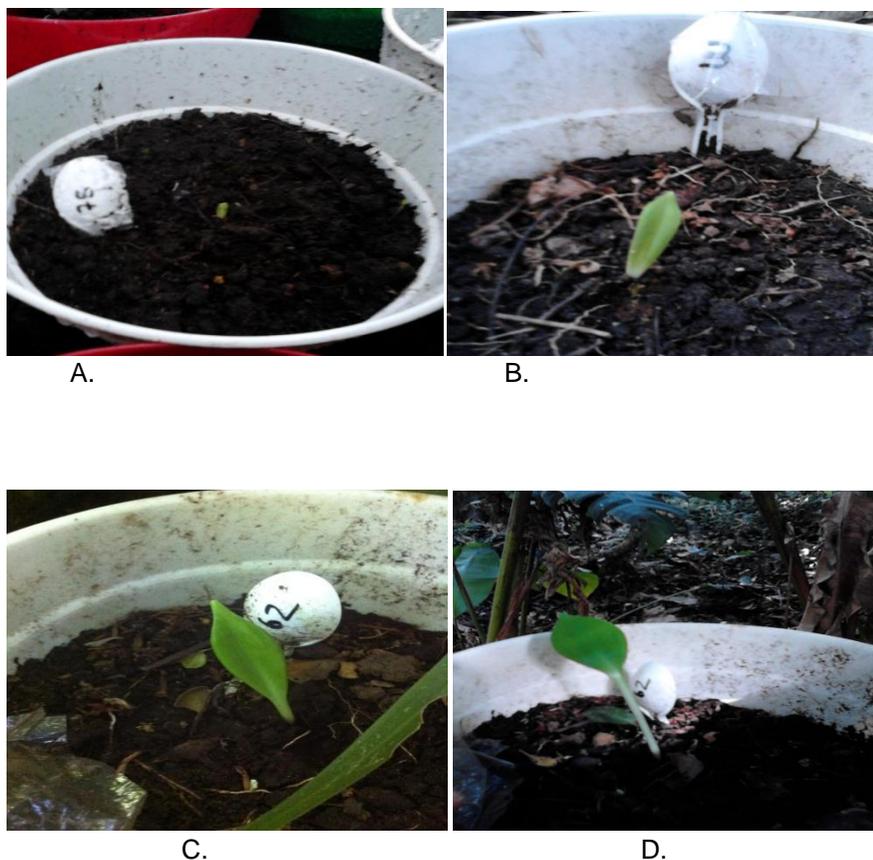


**Tabla 17.** Porcentaje de individuos en cada estado fenológico, observado en plantas de *Caliphruria subedentata* establecidas sin fertilización y condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico Universidad del Cauca.

DDS	Sin Emergencia % individuos	Etapa vegetativa % individuos	Floración % individuos	Fructificación % individuos
30	100%	0	0	0
60	83.34%	0	16.66%	0
90	16.68%	41.66%	41.66%	0
120	16.68%	41.66%	33.33%	8.33%
150	16.68%	41.66%	8.33%	33.33%
180	0	58.33%	8.33%	33.33%
210	0	58.33%	8.33%	33.33%

DDS= días después de la siembra.

**Figura 14.** Hojas de *Caliphruria subedentata* en diferentes estados de desarrollo, en plantas establecidas en condiciones de sotobosque en el Jardín botánico de la Universidad del Cauca, a) primera hoja en emergencia, b) hoja adquiriendo la forma típica con inicio del desarrollo del peciolo, c) hoja con relación a las anteriores en estado de desarrollo más avanzado y d) hoja en estado de madurez.



#### 8.4.2. Etapa Reproductiva.

**Floración:** La fase de floración en este conjunto de individuos, inició en promedio a los 69.6 días después de la siembra, durando en promedio 50.2 días esta fase (Tabla 13). En cinco plantas la floración ocurrió previa a la emergencia de la primera hoja (Figura 15). Este comportamiento coincide con las observaciones realizadas por O' Gorman 1963, quien reportó la aparición de flores, antes que las hojas en plantas de *Zephyrantes* nativas del Valle de México, que forman parte de la misma familia que *Caliphruria*. A los 90 días después de la siembra (Tabla 17), un 41.66 % de los individuos alcanzaron la floración. La longitud del escapo para estas plantas fue de 24.18 cm en promedio, el número promedio de flores desarrolladas por planta fue de 4.4 flores (Tabla 13). La floración en cada planta (Figura 16) no fue sincrónica, de modo que fue posible observar en una misma planta flores en diferentes estados de desarrollo. La emergencia del escapo coincide con el momento de transición de la época lluviosa y el inicio de la temporada seca, de la mitad de año.

Respecto a las plantas fertilizadas, un mínimo porcentaje de individuos tratados con macronutrientes (6.2%) alcanzó la etapa reproductiva, 154 días después de la siembra. La longitud del escapo, de la única planta que floreció fue de 34 cm, el número de flores desarrolladas fue de cinco.

**Figura 15.** Etapa reproductiva en plantas de *Caliphruria subedentata*, que fueron sembradas sin fertilización y en condiciones de sotobosque en el Jardín Botánico de la Universidad del Cauca. En algunas plantas, antes de la emergencia de la primera hoja, emergió el escapo.



**Figura 16.** Estructuras reproductivas de *Caliphruria subedentata* en diferentes estados de desarrollo, en plantas establecidas sin fertilización y condiciones de sotobosque en el jardín botánico de la Universidad del Cauca, a) inicio de la floración con la emergencia del escapo, b) escapo en crecimiento y c) flores en diferentes estados de desarrollo.



**Fructificación:** La fase inició en promedio a los 122 días después de la siembra (Tabla 13). Un 33.33 % de las plantas se encontraban en fructificación a los 150 días después de la siembra (Tabla 17). El número promedio de frutos por planta fue de 3.75 (Figura 17), que incluso caían al suelo sin alcanzar la madurez plena. Del 41.66% de individuos que florecieron, una planta no desarrolló frutos, al finalizar el período de seguimiento.

**Figura 17.** Frutos y flores en diferentes estados de desarrollo, en plantas de *Caliphruria subedentata* establecidas sin fertilización y condiciones de sotobosque, en el jardín botánico de la Universidad del Cauca.



El inicio de la etapa de fructificación para la planta que estaba tratada con macronutrientes, fue a los 189 días después de la siembra. A los 219 días después de la siembra, en los frutos aún verdes ocurrió la abscisión. El número de frutos presentes en la planta, fue de cinco.

## 9. CONCLUSIONES.

- La fertilización con macronutrientes tuvo un efecto en el tiempo requerido para alcanzar el ancho máximo de la segunda hoja en *Caliphruria subedentata*. Este tiempo fue menor que el requerido por la segunda hoja de plantas sometidas a los tratamientos desprovistos de fertilización con macronutrientes.
- La fertilización con macronutrientes no influyó en las variables de crecimiento: altura de la planta, área foliar, número de hojas y bulbos, peso fresco y seco de hojas y bulbos y peso seco de raíces.
- La fertilización con micronutrientes no ejerció efecto alguno sobre las diferentes variables de crecimiento, estimadas en este ensayo en plantas de *Caliphruria subedentata*
- Debido a que *Caliphruria subedentata* es una planta de desarrollo lento, es posible que el tiempo de observación en este bioensayo, haya sido insuficiente para apreciar el efecto de los tratamientos.
- La ausencia de efecto de los tratamientos de fertilización con macro y micronutrientes sobre la mayoría de variables asociadas al crecimiento de plantas de *Caliphruria subedentata*, permite inferir que esta especie en condiciones naturales es poco exigente en cuanto a requerimientos nutricionales, ya que los nutrientes contenidos en el suelo utilizado para este ensayo suplieron sus requerimientos..
- Los bulbos de plantas de *Caliphruria subedentata* fertilizadas con macronutrientes alcanzaron un mayor contenido de galantamina, con relación a los provenientes de plantas sometidas a los demás tratamientos, debido quizá a la aplicación de nitrógeno al suelo en ese tratamiento.

## 10. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de la nutrición mineral en el contenido de metabolitos secundarios con actividad biológica en otras especies nativas de la familia Amaryllidaceae.
- Realizar programas de propagación vegetal de *Caliphruria* y otras especies de Amarilidáceas en peligro de extinción, que permitan su conservación y faciliten la realización de bioensayos.
- Investigar el efecto de la nutrición mineral sobre otros alcaloides presentes en *Caliphruria subdentata*.
- Realizar estudios fenológicos y de parámetros fisiológicos en plantas de *Caliphruria subdentata* y otras especies de la familia Amaryllidaceae, ya que hay pocos estudios sobre su biología.
- Realizar futuros ensayos sobre *Caliphruria subdentata* en un tiempo mayor al establecido para este ensayo, ya que esta especie presenta un desarrollo lento.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Ahmad, E., Ahmad, R., Saifullah, Ashraf, M.Y. & Ehsanullah. (2011). Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), pp. 764-777.
2. Añez, B. y Tavera, E. (1986). Aplicación de nitrógeno, fósforo y potasio a diferentes poblaciones de plantas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 7, p.10.
3. Azcon-Bieto, J. y Talón, M. (1993). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Barcelona: Mc-Graw-Hill Interamericana.
4. Barrera, J., Cruz, M. y Melgarejo, L. (2010). Nutrición mineral. En: L. Melgarejo. *Experimentos de fisiología vegetal* (pp. 79-105). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
5. Benavides, L., Bermúdez, O., Cabezas, F., Mosquera, P. y Torres, A. (2009). Aproximación a la ruta metabólica de *Caliphruria subdentata* (Amaryllidaceae) mediante la caracterización histológica de la lámina foliar. *Acta Microscópica*, 18, pp. 482.
6. Bolaños, G., Feuillet, C., Chito, E., Muñoz, E. y Ramírez, B. (2010). Vegetación, estructura y composición de un área boscosa, en el Jardín Botánico “Álvaro José Negret”, vereda La Rejoya, Popayán (Cauca, Colombia). *Boletín Científico Centro de Museos, Museo de Historia Natural*, 14 (2), pp. 19-38.
7. Bonner, J. (1995). Flower bulbs slow brain disease. *New Scientist*, p 21.
8. Cabezas, F. (2002). *Estudio fitoquímico de alcaloides de Crinum cunthianum Roem y Eucharis amazonica Planchon y Linden (Amaryllidaceae)*. Tesis doctoral en Ciencias Químicas. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
9. Cabrera, A. (1968). *Flora de la provincia de Buenos Aires. Parte I*. Buenos Aires: I.N.T.A.

10. Camargo, I. D. (2006). Nuevas perspectivas para el estudio de la asignación de biomasa y su relación con el funcionamiento de plantas en ecosistemas tropicales. En: *Acta Biológica Colombiana [en línea]*, 11(1). Recuperado de <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2006000300006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2006000300006)> [citado en 22 de abril de 2015].
11. Chen, Y., Qiaosheng, G., LI, L., LI, L. & Zaibiao, Z. (2011). Influence of fertilization and drought stress on the growth and production of secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(9), pp. 1749-1755.
12. Cohelo, L. C., Shigueto, L., Lázaro, C., Amaral, G., De Pinho, P. y Guedes, J. (2011). Caracterização de sintomas visuais, parâmetros de crescimento e desenvolvimento de *Tagetes erecta* sob deficiências nutricionais. *Revista Agrarian*, 4(12), pp. 113-122.
13. Cruz Muñoz, M., Castro Ramírez, L. y Macías Pinto, D. (2011). Niñez e interpretación ambiental en el proyecto Jardín Botánico de la Universidad del Cauca Álvaro José Negret (UCAJN). *Revista Luna Azul*, (32), pp. 82-94.
14. Dahlgren, R. (1980). A revised system of classification of angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 80, p. 91.
15. Dahlgren, R. (1985). The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, p. 520.
16. De Almeida, R. M., Frazao, P., Shahidian, S. Y Azevedo, R. (2012). Influencia do azoto no crescimento da cebola antes do inicio da formacao do bolbo. *Revista de Ciências Agrárias*, 35(1), pp. 88-95.
17. Diop, M., Hehn, A. & Ptak, A. (2007). Hairy root and tissue culture of *Leucojum aestivum* L. – Relationships to galanthamine content. *Phytochemistry Reviews*, 6, pp. 137-141.
18. Dzida, K., Jarosz, Z. y Michalojc, Z. (2012). Effect of nitrogen fertilization on the yield and nutritive value of *Beta vulgaris*. *Journal of Elementology*, pp. 19-29.

19. Gárate, A. y Bonilla, I. (2008). Nutrición mineral y producción vegetal. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón, *Fundamentos de fisiología vegetal* (pp. 113-130). Barcelona: Interamericana McGraw-Hill.
20. García-Serrano, P., Lucena, J., Nogales, M. y Ruano, S. (2009). El suelo, los nutrientes, los fertilizantes y la fertilización. En: *Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España* (p. 20). España: Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
21. García, D. (2004). Evaluación de los principales factores que Influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). *Pastos y Forrajes*, 27(3), pp. 267-271.
22. Ghosal, S., Razdan, S. y Saini, K. (1985). Crinum alkaloids: their chemistry and biology. *Phytochemistry*, 24(10), p. 2141.
23. Hartmann, T. (1992). Alkaloids in herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. *The Chemical Participants*, 1, pp. 79-121.
24. Heinrich, M. & Teoh, H. L. (2004). Galanthamine from snow-drop- the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, pp. 147-162.
25. Hoshino, O. (1998). The Amaryllidaceae alkaloids. En: G. Cordell, *The alkaloids chemistry and pharmacology* (p. 323-424). New York: Academic Press Inc.
26. Howard, R. (1987). *Cultivos hidropónicos, nuevas técnicas de producción*. (2ª edición). Versión Española De Santos Caffarena, J. España: Ediciones Mundi-Prensa.
27. Khan, A., Ullah, W., Malik, A., Ahmad, R., Saleem, B. & Rajwana, I. (2012). Exogenous applications of boron and zinc influence leaf nutrient status, tree growth and fruit quality of Feutrell's Early (*Citrus reticulata* Blanco). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 49(2), pp. 113-119.
28. Li, H. L. & Willaman, J. (1968). Distribution of alkaloids in angiosperm phytoeny. *Economic Botanic*, 22, p. 239.

29. López-Ferrari, A.R. Espejo-Serna, A. (2002). *Flora de Veracruz, Amaryllidaceae. Fascículo 128*. Veracruz: Instituto de Ecología, A.C. Xalapa.
30. Lutz, J., Lawrence, R., Rowe, J., Tricoli, D. & Wong, J. (1985). *Tissue culture in forestry and agriculture*. (Vol.32). New York: Eds Basic Life Sciences Plenum Press.
31. Lubbe, A., Hae Choi, Y., Vreeburg, P. & Verpoorte, R. (2011). Effect of fertilizers on galanthamine and metabolite profiles in Narcissus bulbs by H NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp. 3155-3161.
32. Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. (2<sup>a</sup> edición). San Diego California: Academic press limited.
33. Meerow, A. (1989). Systematics of the amazon lilies, *Eucharis* and *Caliphruria* (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76(1), pp. 154-155.
34. Meerow, A. & Snijman, D. (1998). Amaryllidaceae. En: K. Kubitski, *The families and genera of vascular plants* (pp. 83-110). Berlin/New York: Springer.
35. Mejía, M. S. (2010). *Conceptos sobre fisiología de absorción y funciones de los minerales en la nutrición de plantas*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
36. *Missouri Botanical Garden*. Angiosperm phylogeny website [en línea]. Recuperado de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [citado en 19 de noviembre de 2015].
37. O’Gorman, H. (1963). *Plantas y flores de México*. México: D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
38. Oliet, J., Planelles, R. y López, M. (1996). Efecto de la fertilización en vivero sobre la supervivencia en plantación de *Pinus alepensis*. *Cuadernos de la S.E.C.F.*, (4), pp. 69-79.
39. Palumbo, M., Putz, F. & Talcott, S. (2006). Nitrogen fertilizer and gender effects on the secondary metabolism of yaupon, a caffeine-containing North American holly. *Springer-Verlag. Oecología*, 151, pp. 1-9.

40. Ru, Q., Wang, X., Tingwu, L. & Zheng, H. (2011). Physiological and comparative proteomic analyses in response to nitrogen application in an Amaryllidaceae plant, *Lycoris aurea*. *Acta Physiologiae Plantarum*, pp. 1-12.
41. Salamanca, C. y Baquero, J. (2006). Soya (*Glycine max* (L.) Merrill) Alternativa para sistemas de producción de la Orinoquía colombiana: CORPOICA C.I. La Libertad. Villavicencio, Meta. En: *Manual Técnico No. 09* (p. 152). Bogotá D.C.: Editora Guadalupe Ltda.
42. Saraiva Leao, D., Lucineido, A. y Paes, J. (2011). Estado nutricional de sorgo cultivado sob estresse hídrico e adubacao fosfatada. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41(1), pp. 74-79.
43. Schumann, A., Bastida, J., Berkov, S., Claus, D., Codina, C. & Gerth, A. (2012). Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Journal Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, pp. 1907-1920.
44. Silverstone, P. A. (2011). *Los muertos vivos. La historia natural de cuatro lirios amazónicos del suroccidente de Colombia (Eucharis y Plagiolirion, Amaryllidaceae)*. Cali: Universidad Del Valle.
45. Stera, A. & Ctepa, A. (2012). Physiological response of young bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) to selected nutrient deficiencies. *Agricultural Sciences*, 4(8), pp. 51-55.
46. Taiz, L. & Zeiger, E. (1998). *Plant physiology*. (3<sup>rd</sup> edición). Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
47. Troyanos, Y.E. & Roukounaki, E. (2011). Response of young olive trees to nitrogen fertilization. *Hellenic Plant Protection Journal*, 4, pp. 13-19.
48. Universidad de Buenos Aires (2008). *Las plantas y los minerales*. Buenos Aires: Catedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía.
49. Vasuki, S., Rao, V.S., Rao, K.V. (1980). Effect of micronutrients and their interactions on growth and alkaloids production in *Catharanthus roseus* (L) G. *Plant Sciences*, 89, pp. 197-201.

50. Vyn, T., Brouder, S., Bruuselma, T., Jackson, C.J., Istvan, R. & Yin, X. (1998). Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), pp. 3501- 3506.
51. Willis, J. (1988). Amaryllidaceae. En: A. Shaw, *A dictionary of the flowering plants and ferns* (8th ed., p. 125). Cambridge: Cambridge University Press
52. Yaber-Grass, M., Ciancia, M. y Leicach, S. (2009). Variación en la producción de alcaloides en inflorescencias de *Senecio grisebachii* por deficiencia de nutrientes. *Ciencia del Suelo*, 27(1), pp. 31-39.
53. Yanza, A. (2009). *Determinación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de galantamina en Phaedranassa dubia (Amaryllidaceae) en la zona de la Sierra y Rosas (Cauca) y su relación con macro y micronutrientes en el suelo*. (Trabajo de grado para optar al título de Químico). Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Quí
54. Zhang, B.G., Chen, Q.X., Luo, S.B., Zhang, C.Y., Yang, Q. & Liu, K.D. (2012). Effects of NPK deficiencies on root architecture and growth of cucumber. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14(1), pp. 145-148.
55. Zhong, J. (2005). Amaryllidaceae and sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*, 22, pp. 111–126.

## ANEXO

**Anexo 1.** Curva de calibración usada como referencia para el análisis del contenido galantamina en plantas de *Caliphruria subedentata* cultivadas en condiciones de sotobosque.

