

Características reproductivas de nueve variedades de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzch)*

Reproductive characteristics of nine varieties of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzch)

Jesús Vargas-Araujo¹, María Andrade-Rodríguez^{1§}, Óscar Gabriel Villegas-Torres¹, Antonio Castillo-Gutiérrez¹, María Teresa Colinas-León², Edilberto Avitia-García² e Irán Alia-Tejacal¹

¹Posgrado en Ciencia Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del estado de Morelos. Av. Universidad 1001. CP. 62209. Tel. (01) 777 3297046. Chamilpa, Cuernavaca. Morelos. (jesusvargasar@gmail.com; maria.andrade@uaem.mx; voscar66@yahoo.com.mx; acastillo-g@hotmail.com; iran.alia@uaem.mx). ²Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. CP. 56230. Tel. (01) 595 9521500. Chapingo, Estado de México. (lozcol@gmail.com; edivitia@hotmail.com). [§]Autora para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx.

Resumen

México es el centro de origen de la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzch), no obstante, la producción depende de las variedades generadas en otros países porque no se tienen variedades nacionales. Para el mejoramiento genético de cualquier especie es necesario el estudio de la biología reproductiva. Con base en lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la reproducción de tres variedades de nochebuena de sol (Belén, Juan Pablo, Amanecer navideño) y seis cultivares de sombra (Freedom, Prestige, Ice punch, Nutcracker white, Sonora White glitter y Burgundy) para definir las bases de métodos de mejoramiento genético. Se determinó la viabilidad del polen mediante tinción con aceto-carmín y germinación de polen; se estudió el horario en que las flores estuvieron receptivas, aplicando una gota de H₂O₂ sobre el estigma; se establecieron cuatro tratamientos para determinar el tipo de polinización de las plantas de nochebuena. La investigación fue desarrollada en un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). La viabilidad del polen varió de 68 a 93%. La mayor receptividad del estigma se observó a las 14:00 h. Las variedades de sol podrían fungir como hembras

Abstract

Mexico is the center of origin of the poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzch), however, production depends on the varieties generated in other countries because they do not have national varieties. For genetic improvement of any kind study of reproductive biology is necessary. Based on the above, the objective of this research was to evaluate the reproduction of three varieties of poinsettia of sun (Bethlehem, John Paul, Christmas Dawn) and six cultivars of shadow (Freedom, Prestige, Ice Punch, Nutcracker white, Sonora White glitter and Burgundy) to define the bases of breeding methods. The viability of pollen was determined by staining with aceto-carmine and pollen germination; the schedule was studied when the flowers were receptive, applying a drop of H₂O₂ on stigma; four treatments were established to determine the type of pollination of the poinsettia plants. The research was developed in a completely randomized design. An analysis of variance and mean comparison test with Tukey test ($p \leq 0.05$). Was performed. The viability of pollen varied from 68 to 93%. The greater receptivity of the stigma was observed at 14:00 h. The sun varieties could act as females in a breeding program because of greater viability of pollen,

* Recibido: enero de 2017
Aceptado: marzo de 2017

en un programa de fitomejoramiento por tener mayor viabilidad del polen, flores receptivas, y amarre de fruto. Las variedades Nutcraker white y Prestige no presentaron receptividad del estigma ni amarre de fruto. Se determinó que el tipo de polinización de la nochebuena fue cruzada.

Palabras clave: nochebuena, receptividad del estigma, tipo, de polinización, viabilidad del polen.

Introducción

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzsch), también conocida como pascua, flor de navidad, estrella de navidad o Poinsettia, es originaria de la región que va desde el norte del estado de Morelos hasta el municipio de Taxco, Guerrero (Trejo *et al.*, 2012). Aunque México es el centro de origen de esta planta, la producción de nochebuena depende de las variedades generadas en otros países. Las nuevas variedades que llegan a México han sido liberadas al menos dos años antes en el país donde fueron generadas. El pago de regalías por el uso de estos nuevos genotipos es de aproximadamente 10% del costo de cada planta, mismo que se incluye en el precio de venta del esqueje.

Las plantas del género *Euphorbia* se caracterizan por tener una flor femenina, sin pétalos y usualmente sin sépalos, rodeada por flores masculinas, todo en una estructura en forma de copa llamada ciato hermafrodita; también pueden tener ciatos femeninos y masculinos. En las inflorescencias hay hojas modificadas denominadas brácteas que pueden ser de color rojo, rosa y blanco (Recanses y Flores, 1983), en diferentes tonalidades o combinaciones de colores.

Los estudios relacionados con receptividad del estigma, calidad del polen y tipo de polinización de las especies son de gran importancia en investigaciones relacionadas con la reproducción sexual, pues permiten asegurar el éxito de las hibridaciones e incrementar la eficiencia del mejoramiento (Weller *et al.*, 2007).

La receptividad estigmática es un parámetro floral que determina el tiempo en el que los estigmas mantienen la capacidad de generar un ambiente propicio para la germinación de los granos de polen, afectando directamente al éxito reproductivo y repercutiendo en la cosecha, cuando se trata de especies cultivadas; sin embargo, se desconocen los factores que la determinan (Lozada

receptive flowers, and fruit binding. The Nutcraker White and Prestige varieties showed no stigma receptivity or fruit binding. It was determined that the pollination type of the poinsettia was crossed.

Keywords: poinsettia, stigma receptivity, type of pollination, pollen viability.

Introduction

The poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzsch), also known as easter, christmas flower, christmas star or poinsettia, is native to the region from the northern state of Morelos to the municipality of Taxco, Guerrero (Trejo *et al.*, 2012). Although Mexico is the center of origin of this plant, the production of poinsettia depends on the varieties generated in other countries. The new varieties that arrive in Mexico have been released at least two years earlier in the country where they were generated. The payment of royalties for the use of these new genotypes is approximately 10% of the cost of each plant, which is included in the sale price of the cutting.

The plants of the genus *Euphorbia* are characterized by having a female flower without petals and sepals usually without surrounded by male flowers, all in a cup-shaped structure called ciato hermaphrodite; they can also have female and male ciato. In the inflorescences there are modified leaves called bracts that can be red, pink and white (Recanses and Flores, 1983), in different shades or combinations of colors.

The studies related stigma receptivity, pollen quality and type of pollination of the species are of great importance in research related to sexual reproduction, as they allow ensure the success of the hybridizations and increasing efficiency improvement (Weller *et al.*, 2007).

The stigmatic receptivity is a floral parameter that determines the time in which stigmas maintain the ability to generate an environment conducive to the germination of pollen grains, directly affecting reproductive success and impacting on the harvest when it comes to cultivated species; however, the factors that determine it are unknown (Lozada and Herrero, 2006). In nature, stigma receptivity is usually given in conjunction with flower anthesis (Shivanna and Sawhney, 1997), but in the case

y Herrero, 2006). En la naturaleza, la receptividad del estigma generalmente está dada conjuntamente con la anthesis (apertura) de la flor (Shivanna y Sawhney, 1997), pero en el caso de mejoramiento muchas veces prevalece la necesidad de realizar las polinizaciones dirigidas en estados fenológicos determinados. Actualmente las pruebas utilizadas principalmente en frutales para observar la receptividad estigmática, consiste en aplicar gotas de peróxido de hidrogeno en la pared estigmática, al observar burbujeo en ésta indica que hay receptividad (Osborn *et al.*, 1988).

La viabilidad del polen es un factor que afecta el amarre de frutos; aunque existen métodos para determinar la germinación del polen *in vivo*, la viabilidad y el poder germinativo *in vitro* han sido ampliamente utilizados como métodos alternativos (Karapanos *et al.*, 2010). Las pruebas *in vitro* pueden resultar sencillas y rápidas para determinar algunos aspectos relacionados con la fisiología del grano de polen. La viabilidad de polen en *Euphorbias* fue estudiada por Narbona *et al.* (2008) en *E. nicaeensis*, para comparar el nivel de viabilidad entre las flores hermafroditas y masculinas. Con respecto a la germinación de tubos polínicos, Cavalari (2010) evaluó el poder germinativo de las Euphorbiaceas en croto (*Codiaeum variegatum*) y pudo observar granos de polen germinados con un tubo polínico de 7 mm. De igual modo Lyra *et al.* (2011) determinaron 17 y 30% de germinación de granos de polen para dos especies de *Jatropha*.

Aunque el estudio de la biología reproductiva es de fundamental importancia en el mejoramiento genético, en la nochebuena es casi nulo. Huang y Chu (2008) reportan que evaluaron la fertilidad en nochebuena mediante la viabilidad de polen de plantas generadas *in vitro* con la finalidad de mejorar los resultados en sus cruza. Con base en lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar las características reproductivas de tres variedades de nochebuena de sol y seis cultivares de sombra, como base para el mejoramiento genético.

Materiales y métodos

Las variedades de nochebuena de sol estudiadas fueron Belén, Juan Pablo, y Amanecer navideño; y los cultivares de sombra Freedom, Prestige, Nutcracker white, Ice punch, Sonora white glitter y Burgundy (Figura 1), las cuales

of breeding, the need to perform targeted pollinations in certain phenological states often prevails. The tests currently used primarily in fruit to observe the stigmatic consists of applying drops of hydrogen peroxide in the stigmatic wall, observing bubbling it indicates receptivity (Osborn *et al.*, 1988).

The viability of pollen is a factor that affects the mooring of fruits; although there are methods to determine the *in vivo* pollen germination, viability and germination *in vitro* they have been widely used as alternative methods (Karapanos *et al.*, 2010). The *in vitro* tests can be simple and quick to determine some aspects of the physiology of the pollen grain. The pollen viability *Euphorbias* was studied by Narbona *et al.* (2008) in *E. nicaeensis*, to compare the level of viability between hermaphrodites and male flowers. Regarding the germination of pollen tubes, Cavalari (2010) evaluated the germination of Euphorbiaceae in croton (*Codiaeum variegatum*) and could observe pollen grains germinated pollen tube with 7 mm. Similarly, mode Lyra *et al.* (2011) determined 17 and 30% germination of pollen grains for two species of *Jatropha*.

Although the study of reproductive biology is of fundamental importance in genetic improvement, on poinsettia it is almost nil. Huang and Chu (2008) report that evaluated fertility in poinsettia by pollen viability *in vitro* generated in order to improve results in their crossbreed's plants. Based on the above, the objective of the present research was to evaluate the reproductive characteristics of three varieties poinsettia of sun and six shade cultivars, as a basis for genetic improvement.

Materials and methods

The poinsettia varieties of sun were studied Bethlehem, John Paul and Dawn Christmas; and cultivars shadow Freedom, Prestige, Nutcracker white, Ice Punch, Sonora white glitter and Burgundy (Figure 1), which were selected to present male and female reproductive structures (essential for carrying out the study), being of high economic importance, and the most commercialized in Mexico. In the nine poinsettia varieties the viability of pollen was studied by pollen tube germination and staining; were also determined the stigma receptivity, timing appropriate for pollination, as well as the type of pollination.

fueron seleccionadas por presentar estructuras reproductivas masculinas y femeninas (indispensables para efectuar el estudio), por ser de alta importancia económica, y las más comercializadas en México. En las nueve variedades de nochebuena se estudió la viabilidad del polen mediante germinación del tubo polínico y tinción; también se determinó la receptividad del estigma, momento adecuado para la polinización, así como el tipo de polinización.

Viabilidad del polen mediante germinación del tubo polínico

Cuando las anteras se desarrollaron se observaron con una lupa y se registró el día en que estas se abrieron, cuando el polen estaba fresco se tomó y fue cultivado en cajas Petri que contenían medio a base de agar (4 g L^{-1}) y sacarosa (0.06 mol L^{-1}). Se cultivó en incubación a $36 \text{ }^\circ\text{C}$; la cantidad de tubos polínicos germinados se observó a las 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Se realizó el conteo de granos de polen germinados por caja para determinar el porcentaje de germinación y el tiempo requerido para alcanzar al menos 1% de germinación. También se midió la longitud de los tubos polínicos mediante el uso de un microscopio compuesto (Carl Zeiss®) observando a 10 y 40 dioptrías, con el fin de saber el tiempo requerido para la germinación, midiendo así la fertilidad del polen. Se utilizó un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por variedad, cada repetición estuvo constituida por una caja Petri que contenía los granos de polen de tres anteras tomadas al azar.

Viabilidad del polen mediante tinción

La viabilidad del polen se evaluó también mediante tinción con una solución de ácido acético-carmín. En cada planta se recolectaron dos anteras por flor (antes de la liberación del polen), estas se colocaron en un tubo por cada planta, y se fijaron en solución Farmer (3:1, alcohol etílico absoluto, ácido acético glacial), en esta solución se conservaron en refrigeración hasta su evaluación. Para el estudio, se colocó una antera sobre un portaobjetos, se cortó transversalmente, se agregó una gota de colorante aceto-carmín y con la hoja de un bisturí se aplastó suavemente la antera para que liberara el polen en la gota de colorante, se colocó el cubreobjetos y se dejaron transcurrir 5 a 10 s para observar al microscopio (40x) (Carl Zeiss®); para el conteo de granos de polen se realizaron siete preparaciones por cada planta, en cada preparación se observaron cuatro campos en los que se

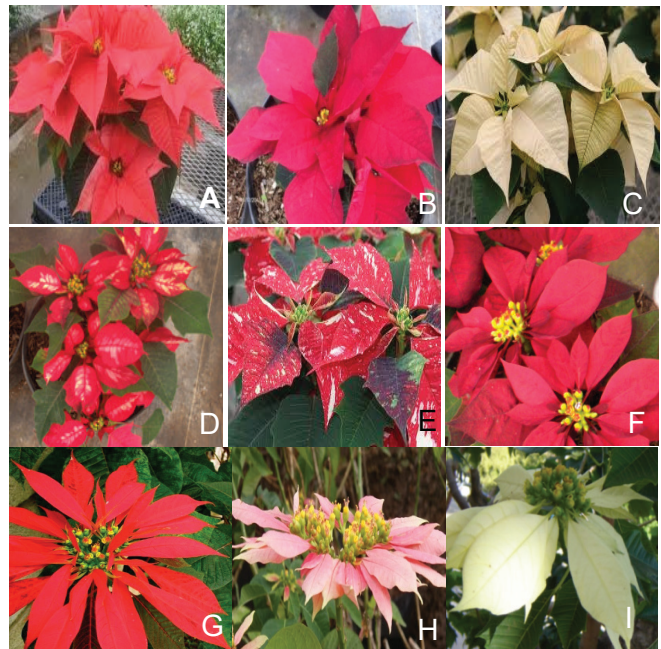


Figura 1. Nochebuena de sombra. A) Freedom; B) Prestige; C) Nutcracker white; D) Ice punch; E) Sonora white glitter; F) Burgundy; nochebuena de sol: G) Belén; H) Juan Pablo; I) Amanecer navideño.

Figure 1. Shade poinsettia. A) Freedom; B) Prestige; C) Nutcracker white; D) Ice punch; E) Sonora white glitter; F) Burgundy; Sun poinsettia: G) Bethlehem; H) John Paul; I) Christmas dawn.

Viability of pollen by pollen tube germination

When the anthers were developed were observed with a magnifying glass and recorded the day when these were opened, when the pollen was fresh was taken and was grown in Petri dishes containing medium based on agar (4 g L^{-1}) and sucrose (0.06 mol L^{-1}). It was cultured in incubation at $36 \text{ }^\circ\text{C}$; the number of germinated pollen tubes was observed at 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h. The count of germinated pollen grains per box was determined to determine the percentage of germination and the time required to reach at least 1% of germination. The length of the pollen tubes was measured by using a (Carl Zeiss®) compound microscope observing 10 to 40 diopters, in order to know the time required for germination and pollen fertility measuring. A completely randomized design was used, with three replicates per variety, each repetition consisted of a Petri dish containing the three anther pollen grains taken at random.

evaluó el número de granos teñidos y el número de granos de polen sin teñir. Con estos datos se determinó el porcentaje de viabilidad del polen en cada variedad. El estudio se realizó en un diseño experimental completamente al azar con siete repeticiones por variedad.

Receptividad del estigma

La receptividad del estigma se comprobó modificando el método de Osborn *et al.* (1988) lo cual consistió en colocar una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 80% sobre los estigmas y tomar como resultado positivo la producción de burbujas, la adecuación del método se realizó debido a que con esta concentración hubo mayor reacción y se pudo observar con mayor eficiencia el burbujeo en el estigma. Este experimento se realizó en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones (plantas) por variedades, en cada planta se tomaron cuatro inflorescencias.

Momento de polinización

Dado que no se dispone de antecedentes del momento de receptividad del estigma, se efectuaron polinizaciones en tres horarios del día (8:00, 14:00, 18:00) tomando como parámetro la cantidad de néctar presente en el nectario de las flores hermafroditas, mismo que se midió con una micro pipeta de 1 000 μ L, realizándose en las nueve variedades, en cuatro inflorescencias de cinco plantas. Además, se realizó la prueba de Osborn *et al.* (1988), para conocer la receptividad estigmática. Se observó la sincronización entre la cantidad de néctar y la receptividad del estigma. Se usó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones (plantas) por variedad, se evaluó la receptividad del estigma y volumen del néctar.

Tipo de polinización

Para determinar el tipo de polinización de las plantas de nochebuena, se evaluaron cuatro tratamientos: 1) emasculación de flores hermafroditas y cubrir completamente para evitar la llegada de polen externo; 2) cubrir las flores femeninas y cuando estuvieron receptivas polinizar con polen de otra planta de la misma variedad para después volver a cubrir, eliminar las flores machos conforme aparecieron; 3) cubrir las flores hembras y cuando estuvieron receptivas fueron polinizadas con polen de la misma planta y cubrir de nuevo; y 4) cubrir las flores hembras y cuando estuvieron receptivas fueron polinizadas con polen de flores de plantas de otra

Viability of pollen by staining

The viability of the pollen was also evaluated by staining with an acetic-carminic acid solution. In each plant, two anthers were collected per flower (before pollen release). These were placed in one tube per plant and fixed in Farmer solution (3:1, absolute ethyl alcohol, glacial acetic acid), in solution were stored in refrigeration until evaluation. For the study, an anther was placed on a slide, cut transversely, a drop of aceto-carminic dye was added and with the blade of a scalpel the anther was gently crushed to release the pollen into the dye drop, coverslip and allowed to elapse 5 to 10 s to observe the microscope ((40x) (Carl Zeiss®); for the pollen grain count seven preparations were made per plant, in each preparation four fields were observed in which the number of stained grains and the number of uncoloured pollen grains were evaluated. With these data the percentage of viability of pollen in each variety was determined. The study was conducted in a completely randomized experimental design with seven replications per variety.

Receptivity of stigma

Stigma receptivity was found by modifying the method of Osborn *et al.* (1988) which consisted of placing a drop of hydrogen peroxide (H_2O_2) of 80% of the stigmas and take a positive result bubble production, the adequacy of the method was performed because this concentration was greater reaction and stigma bubbling was more efficiently observed. This experiment was carried out in a completely randomized design with five replicates (plants) per variety, in each plant four inflorescences were taken.

Moment of pollination

Since there is no antecedent of the receptivity moment of the stigma, pollinations were carried out in three schedules of the day (8:00, 14:00, 18:00) taking as a parameter the amount of nectar present in the nectar of the hermaphrodite flowers, which was measured with a micro-pipette of 1 000 μ L, being performed in the nine varieties, in four inflorescences of five plants. In addition, the test was performed Osborn *et al.* (1988), to know stigmatic receptivity. The synchronization was observed between the amount of nectar and the receptivity of the stigma. A completely randomized design with five replicates (plants) was used per variety, the receptivity of the stigma and volume of the nectar were evaluated.

variedad y cubrir de nuevo. El experimento fue desarrollado en un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones (planta) por variedad, polinizando 15 flores por repetición. Se evaluó el porcentaje de amarre de fruto por planta.

Análisis de datos

En los cinco experimentos, los datos se estudiaron mediante análisis de varianza, prueba de comparación de medias con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa SAS 9.2 (SAS, 2002).

Resultados y discusión

Viabilidad del polen mediante germinación del tubo polínico

En las variedades de nochebuena el estilo del gineceo tuvo una longitud de 6 mm (Figura 2). El tubo polínico inicio su germinación *in vitro* a las 6 h, después de iniciado el cultivo pero fue hasta las 72 h cuando alcanzó los 6 mm necesarios para transportar los gametos masculinos desde el estigma hasta el ovario.

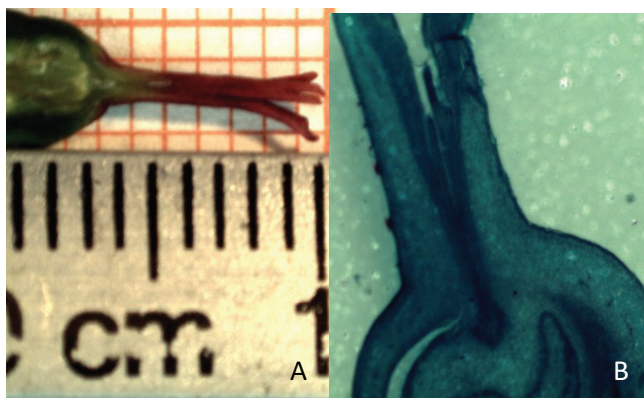


Figura 2. A) longitud del estilo de nochebuena, medido con regla y papel milimétrico; y B) corte anatómico de una flor femenina donde se observa la longitud del estilo.

Figure 2. A) length of poinsettia style, measured with ruler and millimeter paper; and B) anatomical cut of a female flower where the length of the style is observed.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas en la germinación del tubo polínico de las nueve variedades de nochebuena. Las nochebuenas de sol, presentaron la mayor germinación de tubo polínico (>90%),

Type of pollination

To determine the type of pollination of the poinsettia plants, four treatments were evaluated: 1) emasculate hermaphrodite flowers and cover completely to avoid the arrival of external pollen; 2) cover the female flowers and when they were receptive pollinate with pollen from another plant of the same variety and then re-cover, remove the male flowers as they appeared; 3) cover the female flowers and when they were receptive they were pollinated with pollen from the same plant and covered again; and 4) cover the female flowers and when they were receptive they were pollinated with flower pollen from plants of another variety and covered again. The experiment was developed in a completely randomized design, with five replicates (plant) per variety, pollinating 15 flowers per replicate. The percentage of mooring of fruit per plant was evaluated.

Analysis of data

In the five experiments, data were studied by analysis of variance, mean comparison test with Tukey test ($p \leq 0.05$) with program SAS 9.2 (SAS, 2002).

Results and discussion

Viability of pollen by pollen tube germination

In the poinsettia varieties the gynoecium style had a length of 6 mm (Figure 2). The pollen tube germination *in vitro* start at 6 h after initiating the culture but was up to 72 h when it reached 6 mm needed to transport the male gametes from the stigma to the ovary.

The analysis of variance showed highly significant differences in germination of the pollen tube of the nine varieties of poinsettia. The poinsettia of sun had the highest germination of pollen tube (>90%), four of the shade cultivars had 80-84% of viable pollen grains; Nutcracker white presented the lowest viability of pollen (Table 1). The above indicated that the varieties of sun could be good males, the opposite happened with Nutcracker white. These values were higher germination 30 and 17% observed by Lyra *et al.* (2011) in the study conducted with *Jatropha molissima* and *J. ribifolia*. Narbona *et al.* (2005) observed an average of 31.8% of pollen viability in *E. boetica*, which was also lower than what was observed in the present investigation.

cuatro de los cultivares de sombra tuvieron de 80 a 84% de granos de polen viables; Nutcracker white presentó la menor viabilidad del polen (Cuadro 1). Lo anterior indicó que las variedades de sol podrían ser buenos machos, lo contrario ocurrió con Nutcracker white. Estos valores de germinación fueron mayores a 30 y 17% observado por Lyra *et al.* (2011) en el estudio efectuado con *Jatropha molissima* y *J. ribifolia*. Narbona *et al.* (2005) observaron un promedio de 31.8% de viabilidad del polen en *E. boetica*, que también fue menor a lo observado en la presente investigación.

En cuanto al tiempo requerido para la germinación del tubo polínico, Cavalari (2010) realizó un estudio en *Euphorbia* con *Codiaeum variegatum*, y observó que los granos de polen de este género alcanzaron su madurez a las 65 h en el medio de germinación en comparación con las 72 h requeridas por las variedades de nochebuena de esta investigación. Lo anterior, indicó que se requirieron cerca de 72 h después de la polinización para que pudiera ocurrir la fecundación.

Viabilidad del polen mediante tinción

En las preparaciones realizadas para observar al microscopio se presentaron dos tipos de tinciones, los granos de polen que mostraron una coloración intensa fueron los granos viables, mientras que los granos de polen casi transparentes fueron los granos estériles (Figura 3). La viabilidad del polen mediante tinción fue mayor (91 a 93%) en las variedades de sol; cuatro variedades de sombra tuvieron de 80 a 85% de polen viable, en tanto que Prestige y Nutcracker white presentaron los valores menores (Cuadro 1).



Figura 3. A) grano de polen viable en nochebuena; y B) grano de polen no viable, observados a 10 dioptrías.

Figure 3. A) viable pollen grain on poinsettia; and B) non-viable pollen grains, observed at 10 diopters.

Cuadro 1. Viabilidad del polen mediante germinación de tubo polínico a 36 °C y mediante tinción con ácido acético-carmín, en nueve variedades de nochebuena.

Table 1. Viability of pollen by germination of pollen tube at 36 °C and by staining with acetic acid-carmine in nine varieties of poinsettia.

Variedad	Granos de polen germinados (%)	Granos de polen teñidos (%)
Amanecer navideño	91.8 a	92.29 a
Belén	91.9 a	91.69 a
Juan Pablo	92.7 a	93.25 a
Freedom	81.8 b	81.88 b
Burgundy	84.2 b	85.23 b
Ice punch	80.5 b	80.43 b
Sonora white glitter	80.7 b	84 b
Prestige	76.7 c	77.74 c
Nutcracker white	68 d	68.04 d
DMSH ($p \leq 0.05$)	4.5	5.2

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

As for the time required for germination of pollen tube, Cavalari (2010) conducted a study in *Euphorbia* with *Codiaeum variegatum*, and observed that pollen grains of this genus reached maturity at 65 h in the medium of germination compared to the 72 h required by the poinsettia varieties of this research. This indicated that it was required about 72 h after pollination for fertilization to occur.

Viability of pollen by staining

In the preparations made to observe under the microscope two types of stains were presented, the grains of pollen that showed intense coloration were the viable grains, while the almost transparent pollen grains were the sterile grains (Figure 3). The viability of pollen by staining was higher (91 to 93%) in the sun varieties; four shade varieties had 80-85% viable pollen, while Prestige and Nutcracker white showed the lowest values (Table 1).

The viability of pollen by carmine staining was very similar to that obtained with the germination of the pollen tube; therefore, either methodologies were reliable to evaluate the male gametes (Table 1); given the above, it was considered that the assessment of viability by staining pollen grains was adequate because it is a simpler methodology.

La viabilidad de polen mediante tinción con carmín fue muy similar a la obtenida con la germinación del tubo polínico por lo que, cualquiera de las dos metodologías fueron confiables para evaluar los gametos masculinos (Cuadro 1); dado lo anterior, se consideró que la evaluación de la viabilidad mediante tinción de granos de polen fue adecuada por ser una metodología más sencilla.

Receptividad del estigma

Las variedades de sol Juan Pablo, Belén, y Amanecer navideño tuvieron mayor porcentaje de flores (43, 43.7 y 46.3) que presentaron burbujeo, con lo cual se evidenció la receptividad del estigma (Figuras 4 y 5) sin diferencias entre ellas. En contraste, las variedades de sombra tuvieron menor porcentaje de flores receptivas, de éstas Sonora White glitter fue la que presentó la menor receptividad (24%), en tanto que Prestige y Nutcracker white no presentaron burbujeo en el estigma, lo que indicó ausencia de receptividad.

En cuanto a la hora en la que los estigmas estuvieron receptivos, se observó que con excepción de Nutcracker white y Prestige, todas las variedades tuvieron más flores receptivas a las 14:00 h, en la mayoría de las variedades la menor receptividad fue a las 8:00 de la mañana.

Los resultados sugieren que las nochebuenas se encontraron receptivas en el momento del día cuando el clima fue más cálido (14:00 h) (Figura 5), lo cual podría indicar que en lugares más calurosos, la receptividad estigmática podría ocurrir antes de la hora de mayor receptividad observada en esta investigación, donde la temperatura media anual es de 21.5 °C, acorde con lo anterior, Campos (2013) observó que la mejor hora para realizar la polinización de nochebuena en Zacatepec, Morelos (24 °C temperatura media anual) fueron las 11:00 am pues obtuvo mayor cantidad de frutos por planta (1.85) y semillas por fruto (2.56) en comparación con la polinización efectuada a las 12:00 del día, en la cual se cosecharon 1.1 frutos por planta y 0.83 semillas por fruto.

Considerando los resultados obtenidos por Lozada y Herrero (2006), quienes mencionaron que la receptividad estigmática afectó directamente el éxito reproductivo, las variedades Prestige y Nutcracker white que no presentaron receptividad del estigma no tuvieron posibilidad de formar frutos, por el contrario, las nochebuenas de sol al presentar mayor porcentaje de flores receptivas podrían formar mayor

Receptivity of stigma

The sunflower varieties Bethlehem, John Paul and Dawn Christmas had a higher percentage of flowers (43, 43.7 and 46.3) that presented bubbling, which showed the receptivity of the stigma (Figures 4 and 5) without differences between them. In contrast, shade varieties had a lower percentage of receptive flowers, of which Sonora White glitter was the one with the least receptivity (24%), whereas Prestige and Nutcracker white did not show bubbling in the stigma, indicating absence of receptivity.

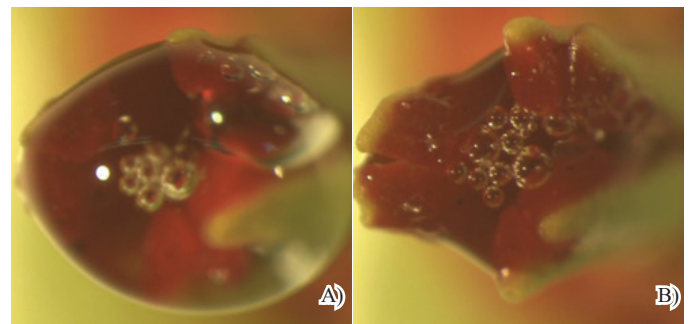


Figura 4. Receptividad del estigma en nochebuena. A y B) burbujeo en el estigma. Método de Osborn (1988).

Figure 4. Receptivity of the stigma on poinsettia. A and B) bubbling in the stigma. Osborn method (1988).

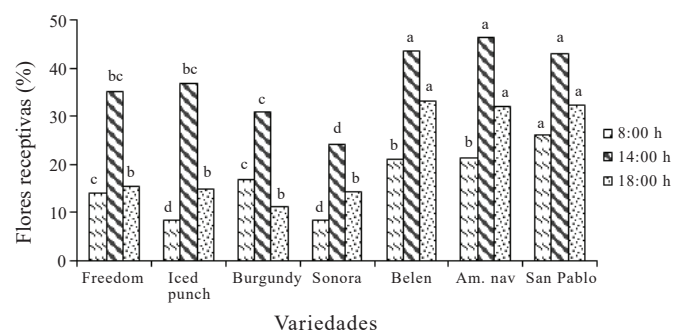


Figura 5. Receptividad del estigma en siete variedades de nochebuena a las 8:00, 14:00 y 18:00 h.

Figure 5. Receptivity of the stigma in seven varieties of poinsettia at 8:00, 14:00 and 18:00 h.

As for the time when the stigmas were receptive, it was observed that with the exception of Nutcracker white and Prestige, all the varieties had more receptive flowers at 14:00 h, in the majority of the varieties the less receptivity was to the 8:00 in the morning.

cantidad de cápsulas. Con base en los resultados, las variedades de sol son candidatas viables para ser las hembras en un programa de mejoramiento genético de nochebuena.

Momento de polinización

La receptividad del estigma fue menor a las 8:00 am en las siete variedades que presentaron receptividad del órgano femenino, en tanto que ésta fue mayor a las 14:00 h, indicando que esa hora correspondió al momento adecuado para realizar la polinización; las tres variedades de nochebuena de sol fueron las que tuvieron mayor porcentaje de flores receptivas (43 a 46%) (Figura 5). Prestige y Nutcracker white no presentaron receptividad del estigma en ninguna de la hora en que se hizo la evaluación, lo que indicó que estas dos variedades no podrían fungir como progenitoras hembras o machos en un programa de mejoramiento genético, ya que además, tuvieron el menor porcentaje de viabilidad de polen.

En todas las variedades, con excepción de Nutcracker white y Prestige, se pudo observar que el néctar comenzó a fluir de los nectarios en las flores masculinas después de la dehiscencia del polen; en tanto que la prueba de receptividad estigmática fue positiva tres días después de la dehiscencia del polen (Figura 6); lo anterior indicó ausencia de sincronización en la madurez de estructuras masculinas y femeninas. Esta podrá ser la razón por la cual la nochebuena es de polinización cruzada, pues como menciona Augspurger (1983) el éxito reproductivo se ve influido por el grado de sincronía de los eventos de floración.

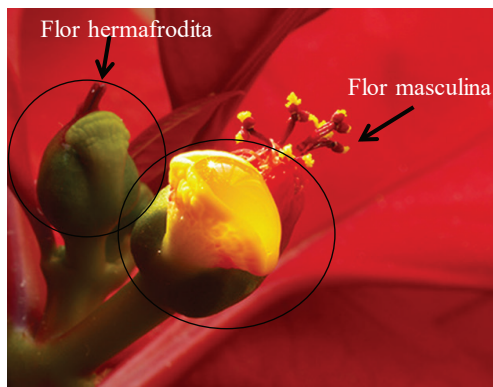


Figura 6. Asincronía floral en nochebuena. Flores masculinas con dehiscencia de polen y nectario, flor hermafrodita inmadura, aun no presenta receptividad estigmática.

Figure 6. Floral asynchrony on poinsettia. Male flowers with dehiscence of pollen and nectaries, immature hermaphrodite flower, still does not present stigmatic receptivity.

The results suggest that poinsettia was receptive at the time of day when the weather was warmer (14:00 h) (Figure 5), which could indicate that in hotter places, stigmatic receptivity could occur before the hour of the highest receptivity observed in this research, where the average annual temperature is 21.5 °C, according to the above, Campos (2013) observed that the best time to perform the pollination at Christmas in Zacatepec, Morelos (24 °C annual mean temperature) were at 11:00 am as they obtained the highest number of fruits per plant (1.85) and seeds per fruit (2.56) compared to the pollination at 12:00 of the day, in which 1.1 fruits per plant were harvested and 0.83 seeds per fruit.

Considering the results obtained by Lozada and Herrero (2006), who mentioned that stigmatic receptivity directly affected reproductive success, the Prestige and Nutcracker white varieties that did not show receptivity to the stigma were not able to bear fruit, on the contrary, poinsettia of sun presenting a higher percentage of receptive flowers could form more capsules. Based on the above results, the sun varieties are the most viable candidates for being females in a genetic improvement program at poinsettia.

Moment of pollination

The receptivity of the stigma was lower at 8:00 am in the seven varieties that showed receptivity of the female organ, while it was higher at 2:00 pm, indicating that this time corresponded to the right moment to perform the pollination; the three varieties of poinsettia of sun were the ones with the highest percentage of receptive flowers (43 to 46%) (Figure 5). Prestige and Nutcracker white did not show stigma receptivity in any of the hour in which the evaluation was done, indicating that these two varieties could not function as female or male progenitors in a breeding program, since they also had the lowest percentage of pollen viability.

In all varieties, except for Nutcracker white and Prestige, it was observed that nectar began to flow from the nectaries in male flowers after pollen dehiscence; while the stigmatic receptivity test was positive three days after pollen dehiscence (Figure 6); the above indicated absence of synchronization in the maturity of male and female structures. This may be the reason why poinsettia is cross-pollinated, as Augspurger (1983) mentions reproductive success is influenced by the degree of synchrony of flowering events.

La cantidad de néctar fue mayor en las variedades de nochebuena de sol > 38 μL , en tanto que, en las variedades de sombra fue 13.5-16.2 μL menor (Cuadro 2). Esta característica estuvo relacionada con la receptividad del estigma, la cual también fue mayor en las variedades de sol (Figura 6). El volumen del nectario podría ser el parámetro que indica el momento de polinización. Sin embargo, es más visible la dehiscencia de polen y se observó que la receptividad de las flores hermafroditas ocurrió tres días después de la liberación de los gametos masculinos, pudiendo ser la dehiscencia del polen un mejor indicador para identificar el momento adecuado para la polinización. Al respecto, Vargas *et al.* (1999) señalaron que en *E. heterophylla* la liberación de polen fue mayor con el aumento de la temperatura ocurriendo un incremento después del medio día o al final de la tarde, esto en Viçosa, Brasil.

La hora adecuada para la polinización será variable en función del lugar, pues la dehiscencia de granos de polen fue afectada por la temperatura y humedad relativa del ambiente de cultivo, como fue reportado por Lisci *et al.* (1994) quienes señalaron que la hora del día para la dehiscencia de las anteras varió en el tiempo y parece estar influenciada por la temperatura y la humedad relativa.

Durante el desarrollo del experimento, en las variedades de sol se observaron diversos insectos polinizadores entre las 12:00 y las 16:00 h, cuando los nectarios tuvieron en promedio 35 μl de néctar; los órdenes de los insectos que se observaron fueron himenóptera, díptera (familia Tachinidae), coleóptera y lepidóptera mariposa monarca (*Danaus plexippus*) (Figura 7) esta última fue la única que se observó en las variedades de sombra.

The amount of nectar was higher in sunshine varieties > 38 μL , while in the shade varieties it was 13.5-16.2 μL lower (Table 2). This characteristic was related to the receptivity of the stigma, which was also higher in the sun varieties (Figure 6). The volume of the nectar could be the parameter indicating the moment of pollination. However, the pollen dehiscence is more visible and the receptivity of the hermaphrodite flowers was observed three days after the release of the male gametes, pollen dehiscence being a better indicator to identify the right moment for pollination. In this regard, Vargas *et al.* (1999) noted that in *E. heterophylla* pollen release was greater with increasing temperature increase occurring after noon or late afternoon, this in Viçosa, Brasil.

Cuadro 2. Volumen de néctar en nueve variedades de nochebuena.

Table 2. Volume of nectar in nine varieties of poinsettia.

Variedad	Volumen del néctar en el nectario (μL)
Belén	38.3 a
Amanecer navideño	38.7 a
Juan Pablo	39.2 a
Prestige	25.7 b
Freedom	26.3 b
Burgundy	24.9 b
Ice punch	25.3 b
Nutcracker white	25.7 b
Sonora white glitter	23 c
DMSH	4.1

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

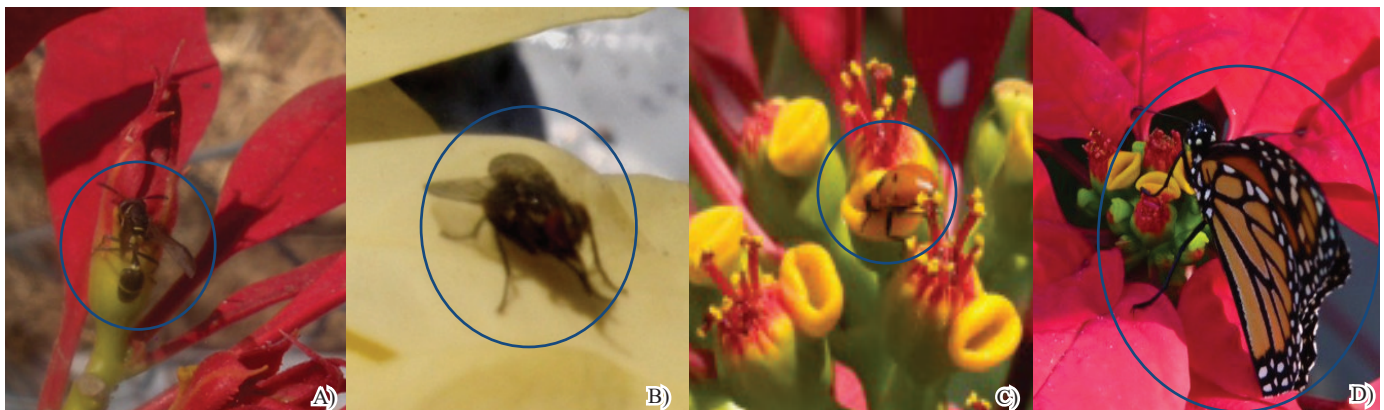


Figura 7. Insectos polinizadores de la nochebuena: A) himenópteros; B) dípteros; C) coleópteros; y D) lepidópteros.
Figure 7. Poinsettia pollinating insects: A) hymenoptera; B) diptera; C) coleoptera; and D) lepidoptera.

Tipo de polinización

El tratamiento 1 que consistió en emascular flores y cubrirlas para evitar la llegada de polen extraño, no hubo formación de frutos, lo cual indicó que la nochebuena no produjo semillas mediante apomixis.

El tratamiento 2 consistió en eliminar las flores machos conforme aparecieron y se polinizaron las flores femeninas con polen de otra planta de la misma variedad, se formaron frutos solo en las variedades de sol, más de dos frutos, teniendo diferencias significativas con las demás variedades, las cuales generaron en promedio menos de un fruto, lo cual reforzó que la nochebuena es una planta de polinización cruzada.

En el tratamiento 3 donde se cubrieron las flores hembras y fueron polinizadas con polen de flores de la misma planta y cubiertas de nuevo, no se observó formación de frutos lo que indicó que fue posible que en la nochebuena hubiera autoincompatibilidad de gametos.

Finalmente, en el tratamiento 4 donde se cubrieron las flores hembras y se polinizaron con polen de otra variedad de nochebuena hubo formación de frutos, manifestando que el tipo de polinización de nochebuena fue cruzado, ya que se formaron frutos en la mayoría de las variedades, con excepción de Prestige y Nutcracker white. La mayor cantidad de frutos se observó en las variedades de sol, en especial en Belén (2.6 frutos en promedio) mientras que las variedades Freedom, Burgundy e Ice punch formaron 0.85 frutos en promedio (Figura 8), los frutos se formaron en las flores hermafroditas.

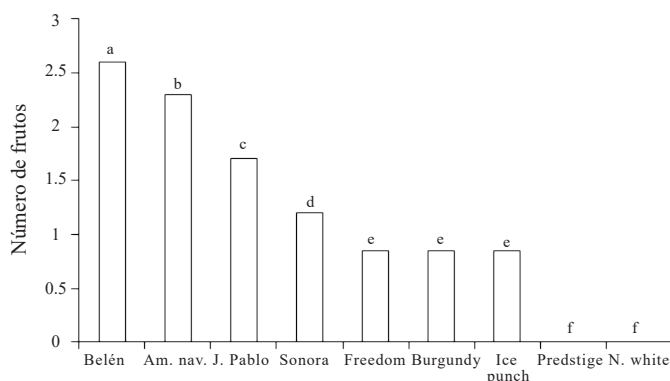


Figura 8. Fructificación en nueve variedades de nochebuena polinizadas con otra variedad (polinización cruzada).
Figure 8. Fruiting on nine poinsettia varieties pollinated with pollen from another variety (cross-pollinating).

The adequate time for pollination is variable depending on the place, as the dehiscence of pollen grains was affected by temperature and relative humidity of cultivation, as reported by Lisci *et al.* (1994) who pointed out that the time of day for anther dehiscence varied over time and appears to be influenced by temperature and relative humidity.

During the development of the experiment, several pollinating insects were observed in the sun varieties between 12:00 and 16:00 h, when the nectaries had on average 35 μ L of nectar; orders of insects that were observed were hymenoptera, diptera (family Tachinidae), coleoptera and lepidoptera monarch butterfly (*Danaus plexippus*) (Figure 7) the latter was the only observed in the varieties of shade.

Type of pollination

The treatment 1 that consisted of emasculating flowers and covering them to avoid the arrival of foreign pollen, there was no fruit formation, which indicated that poinsettia did not produce seeds by apomixis.

In treatment 2 that consisted of eliminating the male flowers as they appeared and pollinated the female flowers with pollen from another plant of the same variety, more than two fruits, having highly significant differences with the other varieties, which generated on average less than one fruit, which reinforced that poinsettia is a cross-pollinated plant.

In treatment 3 where the female flowers were covered and pollinated with flower pollen from the same plant and covered again, no fruit formation was observed which indicated that it was possible that on poinsettia there would be auto incompatibility of gametes.

Finally, in treatment 4 where the female flowers were covered and pollinated with flower pollen from another poinsettia variety, there was fruit formation, indicating that the type of pollination of the poinsettia was crossed, since most fruits were formed of the varieties, with the exception of Prestige and Nutcracker white. The highest number of fruits was observed in the sun, especially in Belen (2.6 fruits on average), while the varieties Freedom, Burgundy and Ice punch formed 0.85 fruits on average (Figure 8), the fruits were formed in the flowers hermaphrodites.

Conclusiones

Las variedades de sol tuvieron mayor viabilidad de polen, flores receptivas, y amarre de fruto, por lo cual pueden servir como hembras en un programa de fitomejoramiento. Nutcraker white y Prestige son variedades que no podrían fungir como hembras porque no presentaron receptividad del estigma ni amarre de fruto. La mayor receptividad del estigma se tuvo a las 14:00 h, misma que ocurre en el periodo de actividad de los insectos polinizadores. Se determinó que el tipo de polinización de la nochebuena es cruzada.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado, así como la beca otorgada (394660) al primer autor para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias.

Literatura citada

- Augspurger, C. K. 1983. Phenology, flowering synchrony and fruit set of six neotropical shrubs. *Biotropica*. 15:257-267.
- Campos, B. E. 2013. Hibridación en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) con la variedad Prestige early y su validación con marcadores morfológicos y moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. 71 p.
- Cavalari, P. O. 2010. Morfología e desenvolvimento floral em croton l. e astraea klotzsch (Euphorbiaceae sensu stricto). Programa de pós-graduação em ciências biológicas. Universidade Estadual Paulista. 80 p.
- Huang, C.H. and Chu, C. Y. 2008. Methods to improve poinsettia fertility. *Scientia Horticulturae*. 3:271-274.
- Karapanos, I. C.; Akoumianakis, K. A.; Olympios, C. M. and Passam, H. 2010. Tomato pollen respiration in relation to in vitro germination and pollen tube growth under favourable and stress-inducing temperatures. *Sex Plant Reproduction*. 23:219-224.
- Lisci, M.; Tanda, C. and Pacini, E. 1994. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae), an anemophilous species flowering all year round. *Ann. Bot.* 74:125-135.
- Lozada, J. M. y Herrero, M. 2006. Estudios de receptividad estigmática en manzano (*malus*pumila*, Mill.). Departamento de Pomología. 10-12 pp.

Conclusions

The sun varieties had greater viability of pollen, receptive flowers, and fruit binding, so they can serve as females in a breeding program Nutcraker white and Prestige are varieties that could not function as females because they did not present stigma receptivity or fruit binding. The greater receptivity of the stigma was at 14:00 h, which occurs in the period of activity of the pollinating insects. It was determined that the pollination type of the poinsettia is crossed.

End of the English version



- Lozada, J. M. y Herrero, M. 2006. Estudios de receptividad estigmática en manzano (*malus*pumila*, Mill.). Departamento de Pomología. 10-12 pp.
- Lyra, D. H.; Sampaio, L. S.; Pereira, D. A.; Silva, A. P. and Amaral, C. L. F. 2011. Pollen viability and germination in *Jatropha ribifolia* and *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae): species with potential for biofuel production. *Afr. J. Biotechnol.* 10:368-374.
- Narbona, E.; Ortiz, P. L. and Arista, M. 2005. Dichogamy and sexual dimorphism in floral traits in the andromonoecious *Euphorbia boetica*. *Ann. Bot.* 955:779-787.
- Narbona, E.; Ortiz, P. L. and Arista, M. 2008. Sexual dimorphism in the andromonoecious *Euphorbia nicaeensis*: effects of gender and inflorescence development. *Ann. of Bot.* 101:717-726.
- Osborn, M. M.; Kevan, P. G. and Lane, M. A. 1988. Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia plaeacantha* (Cactaceae) in southern Colorado. *Plant Systematics and Evolution*. 159:85-94.
- Recanses, P. L. y Flores, L. I. 1983. Cultivo de la poinsettia. *Hortic. Inter.* 13:3-13.
- SAS Institute, Inc. 2002. SAS user's guide: Statistics. Version 9.00. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.
- Shivanna, K. R. and Sawhney, V. K. 1997. Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 28-29 pp.
- Trejo, L.; Feria-Arroyo, T. P.; Olsen, K. M.; Eguiarte, L. E.; Arroyo, B.; Gruhn, J. A. and Olson, M. E. 2012. Poinsettia's wild ancestor in the Mexican dry tropics: historical, genetics, and environmental evidence. *Am. J. Bot.* 99:1146-1157.
- Vargas, L.; Borém, A. y Da Silva, A. A. 1999. Técnica de cruzamientos controlados en *Euphorbia heterophylla* L. *Bragantia*, Campinas. 581:23-27.
- Weller, S.; Domínguez, C.; Molina, F.; Fornoni, J. and Leubhn, G. 2007. The evolution of distyly from tristly in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the sky islands of the Sonoran desert. *Am. J. Bot.* 94:972-985.