

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA

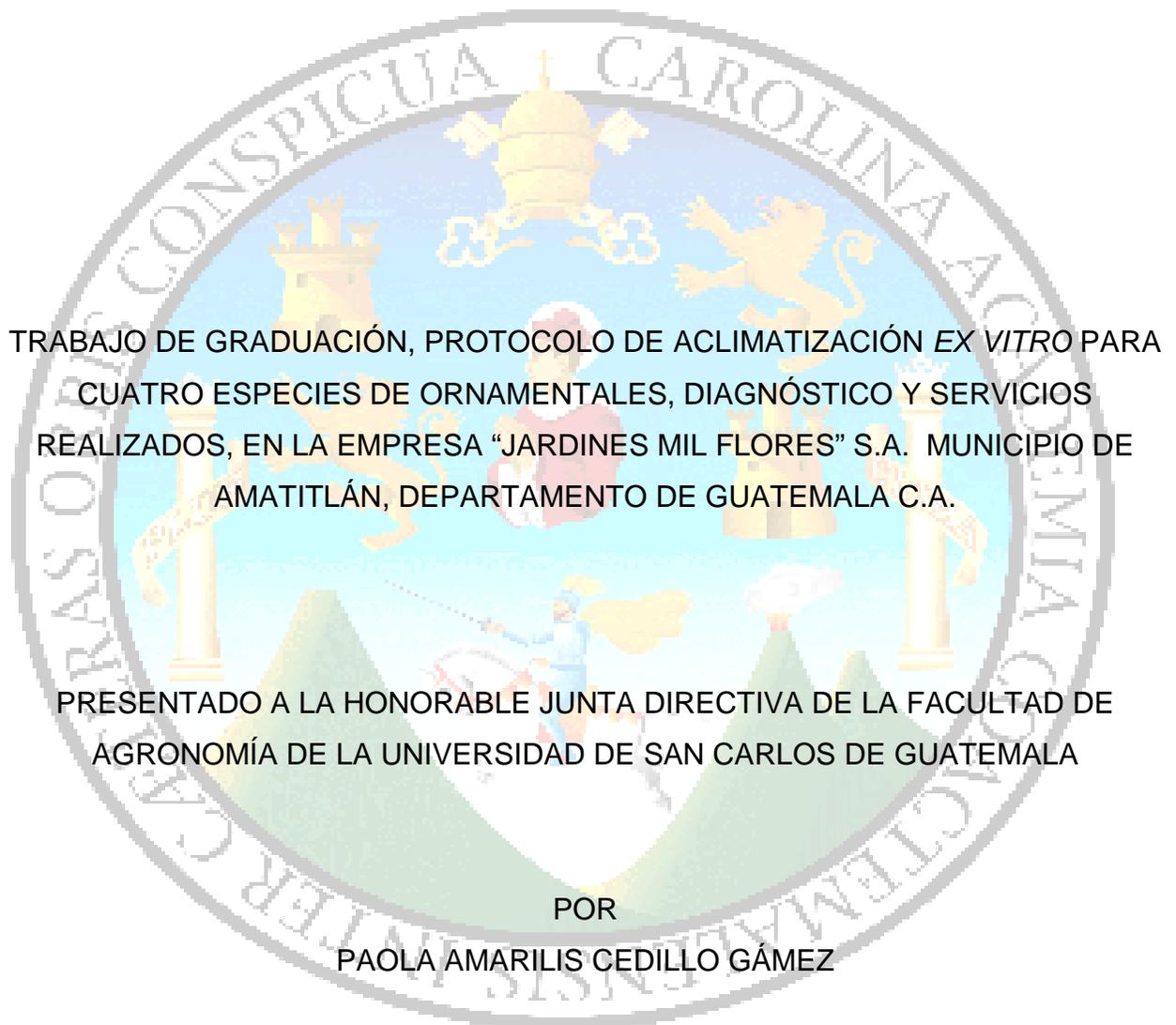
The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a blue background. On the shield, there is a golden crown at the top, a golden lion rampant on the right, and a golden castle on the left. Below the shield, a figure in a red and white robe is seated on a white horse. The shield is flanked by two golden columns. The entire seal is surrounded by a circular border containing the Latin text "UNIVERSITAS CAROLINA AC ACADEMIA COACTEMATELANSIS INTER CATHERARUM OBIS CONSPICUA".

TRABAJO DE GRADUACIÓN, PROTOCOLO DE ACLIMATIZACIÓN *EX VITRO* PARA
CUATRO ESPECIES DE ORNAMENTALES, DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS
REALIZADOS, EN LA EMPRESA "JARDINES MIL FLORES" S.A. MUNICIPIO DE
AMATITLÁN, DEPARTAMENTO DE GUATEMALA C.A.

Paola Amarilis Cedillo Gámez

Guatemala, Noviembre 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a woman in a red dress and white shawl, holding a staff. Above her is a golden crown with a cross. To the left is a golden castle tower, and to the right is a golden lion rampant. Below the central figure is a landscape with green hills and a blue sky. The entire scene is enclosed in a circular border with Latin text: "SACRAS OBRAS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA" at the top and "SACRAE AGRICULTURAE" at the bottom.

TRABAJO DE GRADUACIÓN, PROTOCOLO DE ACLIMATIZACIÓN *EX VITRO* PARA
CUATRO ESPECIES DE ORNAMENTALES, DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS
REALIZADOS, EN LA EMPRESA “JARDINES MIL FLORES” S.A. MUNICIPIO DE
AMATITLÁN, DEPARTAMENTO DE GUATEMALA C.A.

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR
PAOLA AMARILIS CEDILLO GÁMEZ

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERA AGRÓNOMA
EN
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADA

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA

RECTOR MAGNIFICO

LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO
VOCAL PRIMERO
VOCAL SEGUNDO
VOCAL TERCERO
VOCAL CUARTO
VOCAL QUINTO
SECRETARIO

Dr. Lauriano Figueroa Quiñonez
Dr. Ariel Abderraman Ortiz López
Ing. Agr. Marino Barrientos García
MSc. Oscar René Leiva Ruano
Br. Lorena Carolina Flores Pineda
P. Agr. Josué Antonio Martínez Roque
Ing. Agr. Carlos Roberto Echeverria Escobedo

Guatemala, Noviembre 2011

Guatemala, noviembre 2011

Honorable Junta directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de Graduación Protocolo de aclimatización *ex vitro* para cuatro especies de ornamentales, diagnóstico y servicios realizados, en la empresa “Jardines Mil Flores” S.A. Municipio de Amatitlán, departamento de Guatemala C.A., como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Paola Amarilis Cedillo Gámez

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS Por ser mi amigo inseparable, por darme la bendición de descubrir en esta noble carrera mi verdadera vocación, porque contigo a mi lado se que todo lo puedo.

A MARIA SANTISIMA Por ser mi compañera silenciosa, mi ejemplo de mujer y de servicio.

MI MADRE: Amarilis, por enseñarme cada día el camino a Dios, porque siempre nos enseñaste que la mejor herencia era nuestra educación, pero la mejor herencia que tenemos tus hijas es tu gran ejemplo. Te amo.

MI PADRE: Raulito, por enseñarme a amar esta carrera, por ser mi mejor maestro y amigo, por ser mi ejemplo de un profesional integro y responsable. Te amo.

MIS HERMANAS: Evelyn, Por tu apoyo incondicional y tu ejemplo de fortaleza.
Mariana, Porque siempre aprendo de tu nobleza y tu humildad.
Silvia, por ser mi ejemplo de perseverancia y por tu ayuda incondicional
Las amo con todo mi corazón.

MI CUÑADO: Juan, por tu apoyo y tu cariño.

MI ABUELITO: Porque de usted heredamos el amor a esta tierra.

MIS TIOS: Con respeto y cariño

MIS PRIMOS: Con especial cariño a Byron, Edwin, Carol, Karla y Kimberly.

A LA FAMILIA: Araúz Rivera, por ser una segunda familia para mí.

MIS AMIGOS: Rosalba Araúz, Julia Cámel, Gabriel Gálvez, don Gustavo Jacinto, Cándida Tacam, Cesar Torres, Glenda Rodas, Flor Calderón, Luis Méndez, Luis Peñate, Werfel Rodriguez, Paola Ochoa, a la familia Ochoa Roque, José Godoy, Marleny Gonzales, Cristian Chávez, Angel Chimil, a mis hermanas de ECO, Monseñor Erwin Arandi, Julietha Godoy, Shený Solares, Paulina Samayoa, Diego Méndez, Kelder Ortiz. Por la contribución que su vida, ha hecho a mi vida.

SUBÁREA DE MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS:

Por la oportunidad de compartir y aprender de cada uno de ustedes, y por su interés y apoyo en este proceso.

A todos los compañeros estudiantes de la Facultad de Agronomía, con los cuales tuve la oportunidad de compartir en los laboratorios y prácticas

TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

A:

DIOS Y MARIA SANTISIMA

A MI PATRIA GUATEMALA

MIS PADRES

MIS HERMANAS

MIS AMIGOS

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

SUBAREA DE MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS

EMPRESA "JARDINES MIL FLORES S.A."

MIS DOCENTES

MIS COMPAÑEROS.

AGRADECIMIENTOS

A

Dr. David Monterroso, por su apoyo y paciencia durante este proceso.

Ing. Agr. Julio Berdúo, gracias por sus contribuciones a este documento, por su gran apoyo y por siempre estar dispuesto a compartir sus valiosos conocimientos.

Ing. Agr. Domingo Amador, QEPD, por sus oportunos consejos y por todo el apoyo que me brindo.

Ing. Agr. Gustavo Álvarez, por su apoyo durante el EPS.

Dr. Fredy Romero, por la oportunidad brindada, por su apoyo y por todos los conocimientos que con tanta humildad y paciencia compartió conmigo.

Personal del laboratorio de Cultivo de Tejidos y Fitopatología de “Jardines Mil Flores S.A”. con especial cariño a Auri, Claudia, Bea, por su amistad y alegría.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	viii
RESUMEN.....	x
CAPÍTULO I. DIAGNÓSTICO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVO DE TEJIDOS Y FITOPATOLOGÍA, DE LA EMPRESA “JARDINES MIL FLORES S.A”	1
1.1 Presentación.....	2
1.2 Marco Referencial.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.4 Metodología	5
1.5 Resultados.....	6
1.5.1 Misión de Jardines Mil Flores S.A.	6
1.5.2 Visión de Jardines Mil Flores S.A.....	6
1.5.3 Departamentos y Áreas de la empresa	6
1.5.5 Generalidades de los laboratorios.....	9
1.5.6 Laboratorio de Cultivo de Tejidos.....	10
1.5.7 Actividades que se realizan en el laboratorio	11
1.5.8 Principales funciones del laboratorio.....	12
1.5.9 Áreas del laboratorio	13
1.5.10 Principales Normas del laboratorio.....	15
1.5.11 Laboratorio de fitopatología.....	17
1.5.12 Principales Actividades del laboratorio.....	17
1.5.13 Áreas del laboratorio	19
1.6 Conclusiones y Recomendaciones.....	20
1.6.1 Laboratorio de cultivo de tejidos.....	20
1.6.2 Laboratorios de Fitopatología.....	21
1. 7. Bibliografía.....	22
CAPÍTULO II. PROTOCOLO DE ACLIMATIZACIÓN <i>EX VITRO</i> PARA CUATRO ESPECIES DE ORNAMENTALES, EN LA EMPRESA “JARDINES MIL FLORES S.A”, AMATITLÁN, GUATEMALA.C.A.....	23
2.1 Presentación.....	24
2.2. Definición del problema	25
2.3. Marco teórico	26

CONTENIDO	PÁGINA
2.3.1 Concepto de aclimatización	26
2.3.2 Importancia de la aclimatización para el cultivo <i>in vitro</i>	26
2.3.3 Características de las plantas propagadas <i>in vitro</i>	27
2.3.4 Control de las condiciones ambientales en la fase de aclimatización.	29
2.3.5 Factores ambientales dentro de los invernaderos y su influencia en las plantas.....	30
2.3.6 El Sustrato.....	33
2.4. Marco referencial	36
2.4.1 Localización del experimento	36
2.4.2 Material vegetal.....	37
2.5 Objetivos.....	42
2.6 Metodología	43
2.6.1 Diseño experimental.....	43
2.6.2 Descripción de los factores	43
2.6.3 Tratamientos	44
2.6.4 Modelo estadístico	45
2.6.5 Unidad experimental	45
2.6.6 Variables respuesta.....	46
2.6.7 Manejo del experimento	46
2.6.8 Aclimatización de plantas.....	47
2.6.9 Procedimiento en el invernadero.....	48
2.6.10 Toma de datos	52
2.7 Resultados.....	53
2.7.1 Altura de túnel	53
2.7.2 Intensidad lumínica	57
2.7.3 Tipo de sustrato.....	63
2.7.4 Interacción entre altura de túnel, intensidad lumínica y tipo de sustrato.	69
2.7.5 Mejor tratamiento y porcentaje de sobrevivencia a la tercera semana.....	73
2.8 Conclusiones	81
2.9 Recomendaciones	83
2.10 Bibliografía.....	84
ANEXOS.....	88
ANEXO 1 Croquis.....	89
ANEXO 2 Condiciones del experimento.....	90
CAPÍTULO III. SERVICIOS REALIZADOS EN LOS LABORATORIOS DE CULTIVO DE TEJIDOS Y FITOPATOLOGÍA DE LA EMPRESA “JARDINES MIL FLORES S.A”. ...	93

CONTENIDO	PÁGINA
3.1 Presentación.....	94
3.2 Protocolo de iniciación para trece especies de ornamentales, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la empresa “Jardines Mil Flores S.A”	95
3.2.1 Objetivos	95
3.2.2 Metodología	95
3.2.3 Resultados	103
3.2.4 Conclusiones y recomendaciones.....	105
3.3. Prueba de Etanol + Agua desmineralizada y Etanol + Agua desmineralizada estéril, para procedimiento de iniciación.....	107
3.3.1 Objetivos	107
3.3.2 Metodología	107
3.3.3 Resultados	113
3.3.4 Conclusiones y recomendaciones.....	114
3.4.1 Identificación de la especie de <i>Alternaria</i> que ocasiona problemas en cultivos de Zinnia.....	115
3.4.2 Objetivos	115
3.4.3 Metodología	115
3.4.5 Resultados	115
3.4.6 Conclusiones y recomendaciones.....	118
3.5 Identificación del agente causal de Pierna Negra en Geranio	119
3.5.1 Objetivos	119
3.5.3 Metodología	119
3.5.4 Resultados	124
3.5.5 Conclusión	125
3.6 Determinación del hongo causante de contaminación de polen y cabezuelas de Marigold (<i>Tagetes erecta L</i>) (Flor de muerto)	126
3.6.1 Objetivos.	126
3.6.2 Metodología	126
3.6.3 Conclusiones.....	128
3.7 Evaluación <i>in vitro</i> de fungicidas para el control de <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Botritis sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Phytophthora sp.</i>	129
3.7.1 Objetivos	129
3.7.2 Metodología	129
3.7.3 Resultados	131
3.7.4 Conclusiones y recomendaciones.....	141
3.8 Bibliografía.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Organización del área de producción de la empresa.....	8
Figura 2. Organización del departamento de investigación	9
Figura 3. Organización interna de los laboratorios.....	10
Figura 4. Localización del experimento.....	36
Figura 5. Las plantas se trasladaron envueltas en papel mayordomo humedo dentro de bolsas plásticas.....	47
Figura 6. Área aislada para fase de aclimatización.....	48
Figura 7. Túneles cubiertos por sarán, colocados sobre dos bancas de concreto.....	48
Figura 8. El área para aclimatización, contaba con ventilación y sombra, para evitar daño por los rayos directos del sol.....	49
Figura 9. (Derecha) Las bandejas colocadas dentro de los túneles de acuerdo al orden de los tratamientos.....	50
Figura 10. (Izquierda) Previo a la siembra, se humedecieron los sustratos.....	50
Figura 11. Siembra de las plantas en bandejas previamente humedecidas.	50
Figura 12. Plantas fuera de túneles.....	51
Figura 13. Las plantas lavadas y colocadas en el horno.....	52
Figura 14. Gráfico de influencia de la altura de túnel en el peso fresco de raíz de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).....	54
Figura 15. Gráfico de la altura de túnel en el peso fresco de follaje de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).	54
Figura 16. Gráfico de influencia de la altura de túnel en el peso seco de raíz de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).....	56
Figura 17. Gráfico de influencia de la altura de túnel en el peso seco de follaje de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).....	56
Figura 18. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso fresco de raíz de las 4 especies en estudio.....	58
Figura 19. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso fresco de follaje de las 4 especies en estudio.....	59

FIGURA	PÁGINA
Figura 20. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso seco de raíz de las 4 especies en estudio.	61
Figura 21. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso seco de follaje de las 4 especies en estudio.	62
Figura 22. Gráfico de influencia del tipo de sustrato (mezcla o arena) en el peso fresco de raíz de las 4 especies en estudio.	64
Figura 23. Gráfico de influencia del tipo de sustrato (mezcla o arena) en el peso fresco de follaje de las 4 especies en estudio.	65
Figura 24. Gráfico de influencia del tipo de sustrato (mezcla o arena) en el peso seco de raíz de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).	67
Figura 25. Gráfico de influencia del tipo de sustrato, en el peso seco de follaje de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).	68
Figura 26. Gráfico de rendimiento de peso fresco de raíz con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato.	69
Figura 27. Gráfico de rendimiento de peso fresco de follaje con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato.	70
Figura 28. Gráfico de rendimiento de peso seco de raíz con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato.	71
Figura 29. Gráfico de rendimiento de peso seco de follaje con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato.	72
Figura 30. Gráfico de sobrevivencia de Gazania después de tres semanas.	72
Figura 31. Plantas de Gazania mejor adaptadas a las 3 semanas.	74
Figura 32. Gráfico de sobrevivencia de Verbena después de tres semanas según los diferentes tratamientos aplicados.	75
Figura 33. Plantas de Verbena mejor adaptadas a las 3 semanas.	76
Figura 34. Gráfico de sobrevivencia de Clavellina después de tres semanas según los diferentes tratamientos aplicados.	77
Figura 35. Plantas de Clavellina mejor adaptadas a las 3 semanas.	78

FIGURA	PÁGINA
Figura 36. Gráfico de sobrevivencia de Vinca después de tres semanas según los diferentes tratamientos aplicados.....	79
Figura 37. Plantas de Vinca mejor adaptadas a las 3 semanas.....	80
Figura 38A. Ubicación de los tratamientos.....	89
Figura 39. Personal adecuadamente vestido.....	99
Figura 40. Dos tamaños diferentes de explantes A. 4.5cm B.2.0cm.....	99
Figura 41. Explantes sumergidos en Etanol al 70% y colocados en papel mayordomo.....	100
Figura 42. Explantes sumergidos en hipoclorito de sodio al 10%, en diferentes tiempos.....	100
Figura 43. Secado y siembra de explantes en medio de cultivo.....	101
Figura 44. Test en agar nutriente, observación constante, determinar contaminación.	102
Figura 45. Frascos estériles e identificados para tratamiento.....	109
Figura 46. Conteo y limpieza de esquejes para tratamiento.....	109
Figura 47. Aplicación del tratamiento.....	110
Figura 48. Limpieza y siembra de esquejes.....	110
Figura 49. Plantas de Osteospermum en observación, planta contaminada con hongos, quemaduras por el tratamiento.....	111
Figura 50. Test en agar nutriente, se mantuvieron en observación constante.....	102
Figura 51. Planta de Verbena quemadas, en todo los tratamientos.....	117
Figura 52. Conidia de (<i>Alternaria zinniae</i>) 40x.....	117
Figura 53. Planta de Zinnia contaminada con <i>Alternaria zinniae</i>	117
Figura 54. Semilla de Zinnia contaminada con <i>Alternaria zinniae</i>	117
Figura 55. Planta enferma de Geranio y frutos de manzanas inoculadas con partes de tallo, raíces y suelo de Geranios con pierna negra.....	120
Figura 56. Geranio 25 de Junio, Geranio 12 de Julio, Geranio 30 de Julio.....	120
Figura 57. Tallos y raíces de geranio enfermo en agua, para observar crecimiento de micelio.....	121
Figura 58. Prueba de Geranio en agua dos días después.....	122
Figura 59. Siembra de micelio en agar de jugo de tomate.....	122

FIGURA	PÁGINA
Figura 60. Montaje de micelio de cultivo en cultivo de jugo de tomate 40x.....	122
Figura 61. Vesicula llena de zoosporas.....	122
Figura 62. Polen día de la siembra.....	126
Figura 63. Polen a las 24 hrs. de la siembra.....	126
Figura 64. Polen en observación 20x. y polen en observación 40x.....	127
Figura 65. Cabezuela contaminada, contaminación por <i>Botrytis</i> sp.....	127
Figura 66. Aislamiento de <i>Cladosporium</i> sp.	128
Figura 67. Aislamiento de <i>Botrytis</i> sp.....	128

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Factores evaluados	43
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos.....	44
Cuadro 3. Resultados de peso fresco de raíz y de follaje, con respecto a la altura de túnel.....	53
Cuadro 4. Resultados de sobrevivencia a las 3 semanas con respecto a la altura.....	53
Cuadro 5. Resultados de peso seco de raíz, follaje y sobrevivencia a la tercer semana con respecto a la altura de túnel.....	55
Cuadro 6. Resultados del peso fresco de raíz y follaje y sobrevivencia a la tercera semana con respecto al tipo de plástico.....	57
Cuadro 7. Resultado de sobrevivencia a la tercera semana con respecto al plástico.....	57
Cuadro 8. Resultados del peso seco de raíz y de follaje con respecto al tipo de plástico.	60
Cuadro 9. Resultados de peso fresco de raíz y follaje, con respecto al tipo de sustrato....	63
Cuadro 10. Resultados de la sobrevivencia en la tercer semana con respecto al tipo de sustrato.....	63
Cuadro 11. Resultados de peso seco y altura en la tercer semana (Sustrato)	66
Cuadro 12. Sobrevivencia de Gazania a la tercera semana en relación a cada tratamiento	73
Cuadro 13. Sobrevivencia de Verbena a la tercera semana en relación a cada tratamiento	75
Cuadro 14. Sobrevivencia de Clavellina a la tercera semana en relación a cada tratamiento	77
Cuadro 15. Sobrevivencia de Vinca a la tercera semana en relación a cada tratamiento	79
Cuadro 16A. Túnel alto pigmentado primer grupo del 22 de abril al 5 de mayo.....	90
Cuadro 17A. Túnel bajo pigmentado primer grupo del 22 de abril al 5 de mayo.....	90
Cuadro 18A. Túnel alto transparente primer grupo del 22 de abril al 5 de mayo	91
Cuadro 19A. Túnel bajo transparente primer grupo del 22 de abril al 5 de mayo	91

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 20A. Túnel bajo pigmentado segundo grupo del 6 de mayo al 21 de mayo	92
Cuadro 21A. Túnel alto transparente segundo grupo del 6 de mayo al 21 de mayo	92
Cuadro 22A. Túnel bajo transparente segundo grupo del 6 de mayo al 21 de mayo	92
Cuadro 23. Identificación de la especie, fechas de aplicaciones, envío y prueba	96
Cuadro 24. Cuadro de productos y dosis aplicadas por finca	97
Cuadro 25. Tratamientos utilizados	98
Cuadro 26. Resultados de los tratamientos	103
Cuadro 27. Mejor tratamiento por especie	105
Cuadro 28. Tiempos de inmersión en etanol + agua desmineralizada estéril al 70 %)	107
Cuadro 29. Tiempos de inmersión en etanol + agua desmineralizada al 70 %	108
Cuadro 30. Plantas limpias después del tratamiento	113
Cuadro 31. Tratamiento más efectivo por especie	114
Cuadro 32. Evaluación de fungicidas para control de <i>Cladosporium</i> sp.	131
Cuadro 33. Evaluación de fungicidas para control de <i>Botrytis</i> sp.	134
Cuadro 34. Evaluación de fungicidas para control de <i>Fusarium</i> sp.	136
Cuadro 35. Evaluación de fungicidas para control de <i>Pythium</i> sp.	138
Cuadro 36. Evaluación de fungicidas para control de <i>Phytophthora</i> sp.	140

RESUMEN

La empresa “Jardines Mil Flores S.A”, es una empresa de gran prestigio a nivel nacional e internacional. La calidad de sus productos y su interés constante por la innovación, la sitúa en un lugar preferencial en el ramo de los ornamentales.

El presente trabajo de graduación es producto del Ejercicio Profesional Supervisado EPS, efectuado en el año 2008, en los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales y fitopatología de la empresa “Jardines Mil Flores S.A.” ubicada en el municipio de Amatitlán, departamento de Guatemala.

Con la finalidad de conocer las actividades y determinar las necesidades principales de los laboratorios de cultivo de tejidos y fitopatología de la empresa, se elaboró un diagnóstico, de este se obtuvo el tema de investigación, que consistía en un problema principal de la empresa. Así mismo, se identificaron problemas de conocida solución, estos se presentan en este trabajo de graduación como servicios efectuados en los laboratorios.

La investigación consistió en la elaboración de un protocolo de aclimatización *ex vitro* debido a que las plantas procedentes del cultivo de tejidos, presentan un desenvolvimiento anatómico y fisiológico anormal, comparadas con las propagadas tradicionalmente de forma natural (Debergh, 1991). De modo que, la terminología aclimatización implica la transición desde las condiciones *in vitro* a las *ex vitro*, proceso complejo en el cual interviene la mano del hombre (Preece y Sutter 1991).

Existen ciertas características anatómicas que diferencian a las plantas cultivadas *in vitro* de las cultivadas en condiciones naturales; las características diferenciales están en las hojas que son más pequeñas y finas, el pobre desarrollo del parénquima y de la cutícula con una considerable cantidad de espacios de aire en el mesófilo (Debergh, 1991).

Para empresas como “Jardines Mil Flores S.A” es de suma importancia contar con un protocolo de aclimatización, que garantice un buen porcentaje de sobrevivencia de las plantas provenientes del laboratorio de cultivo de tejidos, por esto se procedió a la evaluación de los factores Intensidad lumínica, por medio de dos tipos de plástico uno transparente y uno pigmentado, tamaño de túneles, túneles bajos de 50 cm de altura y túneles altos de 1 m de altura, los cuales tienen una influencia importante en el porcentaje de humedad relativa y un tercer factor fueron los sustratos, debido a que las características de estos influyen de manera directa en el desarrollo de la planta, de modo que se utilizó, arena volcánica al 100% previamente esterilizada con vapor, y una mezcla de arena volcánica 90% y 10% de turba rubia comercial.

Mediante la evaluación de los tres factores antes mencionados, se determinó su influencia en el porcentaje de sobrevivencia a las tres semanas, el peso fresco y seco de las raíces, además, se determinó el peso fresco y seco del follaje; se tomaron en cuenta estas variables respuesta, ya que no basta con la sobrevivencia de las plantas, debido a que para fines comerciales el buen desarrollo de la planta es determinante.

Los servicios consistieron principalmente en las siguientes actividades: Se elaboró un Protocolo de iniciación de trece especies ornamentales, pruebas de desinfección con etanol al 70%, identificación del hongo *Alternaria zinniae* que ocasiona problemas en semillas de Zinnia (*Zinnia elegans*), identificación del agente causal de “Pierna Negra” (*Pythium* sp) en plántulas de Geranio, determinación de los hongos (*Cladosporium* sp y *Botritis* sp) causantes de contaminación en polen y cabezuelas de Marigold (*Tagetes erecta* L) Flor de muerto y evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Cladosporium* sp., *Botritis* sp. *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp.

CAPÍTULO I

**DIAGNÓSTICO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVO DE TEJIDOS Y
FITOPATOLOGÍA, DE LA EMPRESA “JARDINES MIL FLORES S.A.”**

1.1 Presentación

La Empresa Jardines Mil Flores S.A. fue fundada en nuestro país en el año de 1966, su actividad principal es la producción de semillas para exportación, es una empresa que se preocupa por la calidad de sus productos y por la satisfacción de las demandas de sus clientes alrededor del mundo. La empresa se localiza en Km 28.5 Carretera al Pacífico, Cantón Ingenio Amatitlán, en las coordenadas, latitud Norte 14°28'12", longitud Oeste 90° 37'45", cuenta con 94 invernaderos y en ella laboran actualmente alrededor de 635 personas (P. Cedillo Entrevista a personal Febrero 2008).

El laboratorio más grande de la empresa es el de cultivo de tejidos, en el laboran diariamente alrededor de siete personas y el jefe de área, este laboratorio tiene la responsabilidad de proveer material vegetal *in vitro* de alta calidad a toda la empresa, el que le sigue en tamaño y en actividades es el laboratorio de fitopatología, en el laboran dos personas que se encargan también del laboratorio de suelos, estos laboratorios tienen a su cargo el análisis de las muestras de plantas, suelos, semillas y agua, los cuales deben hacerse de forma eficiente y entregar los resultados con puntualidad a las tres fincas, que componen la empresa en Guatemala.

En los laboratorios de Cultivo de Tejidos y Fitopatología se desarrollaron todas las actividades de ejercicio profesional supervisado EPS, por lo que el presente diagnóstico se enfoca en las actividades que se realizan en ellos, resultado de la información obtenida se determinó el tema de investigación y servicios a prestar dentro de los mismos.

1.2 Marco Referencial

La Empresa Jardines Mil Flores, S.A. se encuentra localizada en el Barrio El Ingenio, municipio de Amatitlán del departamento de Guatemala. Ubicada a $14^{\circ}28'43''$ latitud norte y $90^{\circ}37'43''$ longitud oeste. Colinda al norte con el municipio de Villa Nueva, al sur con Palín, Escuintla, al este con Villa Canales y al oeste con Magdalena Milpas Altas y Santa María de Jesús, Sacatepéquez (Barrientos E. 2006).

Se encuentra ubicada a 28.5 km de distancia al sur de la ciudad capital, teniendo acceso por la carretera interamericana al Pacífico (CA-9). Se encuentra ubicada en la zona de vida de Bosque Seco Subtropical (bs-S). Se encuentra a una altitud de 1,189 msnm y una temperatura ambiental promedio anual de 22°C , con humedad relativa ambiental promedio de 74%. Presenta un clima templado (Barrientos E. 2006).

1.3 Objetivos

Objetivo General

- Elaborar un diagnóstico general de la Empresa “Jardines Mil Flores S.A.” y describir la situación actual de los laboratorios de Cultivo de Tejidos, Fitopatología y Suelos de la misma.

Objetivos Específicos.

- Conocer las principales actividades que se realizan en los laboratorios.
- Determinar el tema de investigación y los servicios que se realizarán en los laboratorios.

1.4 Metodología

Elaboración del plan de diagnóstico

La primera fase consistió en la elaboración de un plan de diagnóstico (López et al 2006), en donde se describió la metodología y materiales para la elaboración del presente diagnóstico.

Reconocimiento y recopilación de información

- Consistió en la recopilación de la información general de las principales actividades que se realizan en la empresa y su organización actual.
- Se recopiló información sobre las actividades diarias que se realizan en los laboratorios.

Análisis de la Información

Se procedió a ordenar y analizar la información obtenida, con esto se logró identificar el tema de investigación y los servicios a realizar en los laboratorios, ya que estos deben realizarse de acuerdo a las necesidades principales de cada uno de estos.

1.5 Resultados.

1.5.1 Misión de Jardines Mil Flores S.A.

Ser y sentirnos un ejemplo de producción y exportación de productos en la agricultura no tradicional de Guatemala y el mundo entero.

1.5.2 Visión de Jardines Mil Flores S.A.

Producir la mejor calidad de semilla y esquejes de plantas ornamentales para satisfacer las demandas permanentemente cambiantes de nuestros clientes interesados en forma profunda en la formación, superación y proyección social de nuestro capital humano, así como la conservación, mantenimiento y fortalecimiento de nuestro ambiente.

1.5.3 Departamentos y Áreas de la empresa

La empresa está organizada en los siguientes departamentos.

1. Departamento de Producción. Dividido en:

- Área 1
- Área 2

2. Control de Calidad y Exportaciones

3. Departamento de Operaciones.

4. Departamento de Cultivo

5. Área de Fitomejoramiento y Test

6. Departamento de Planificación

7. Departamento de Investigación y Desarrollo

- Laboratorio de Cultivo de Tejidos
- Laboratorio de Fitopatología.
- Laboratorio de Suelos. (Ver figura 1)

8. Departamento Administrativo.

9. Departamento de Recursos Humanos

- Cafetería
- Jardín Infantil
- Clínicas Médicas

10. Departamento de Personal

11. Departamento de Compras y Suministros

12. Departamento de Contabilidad

13. Departamento Informática.

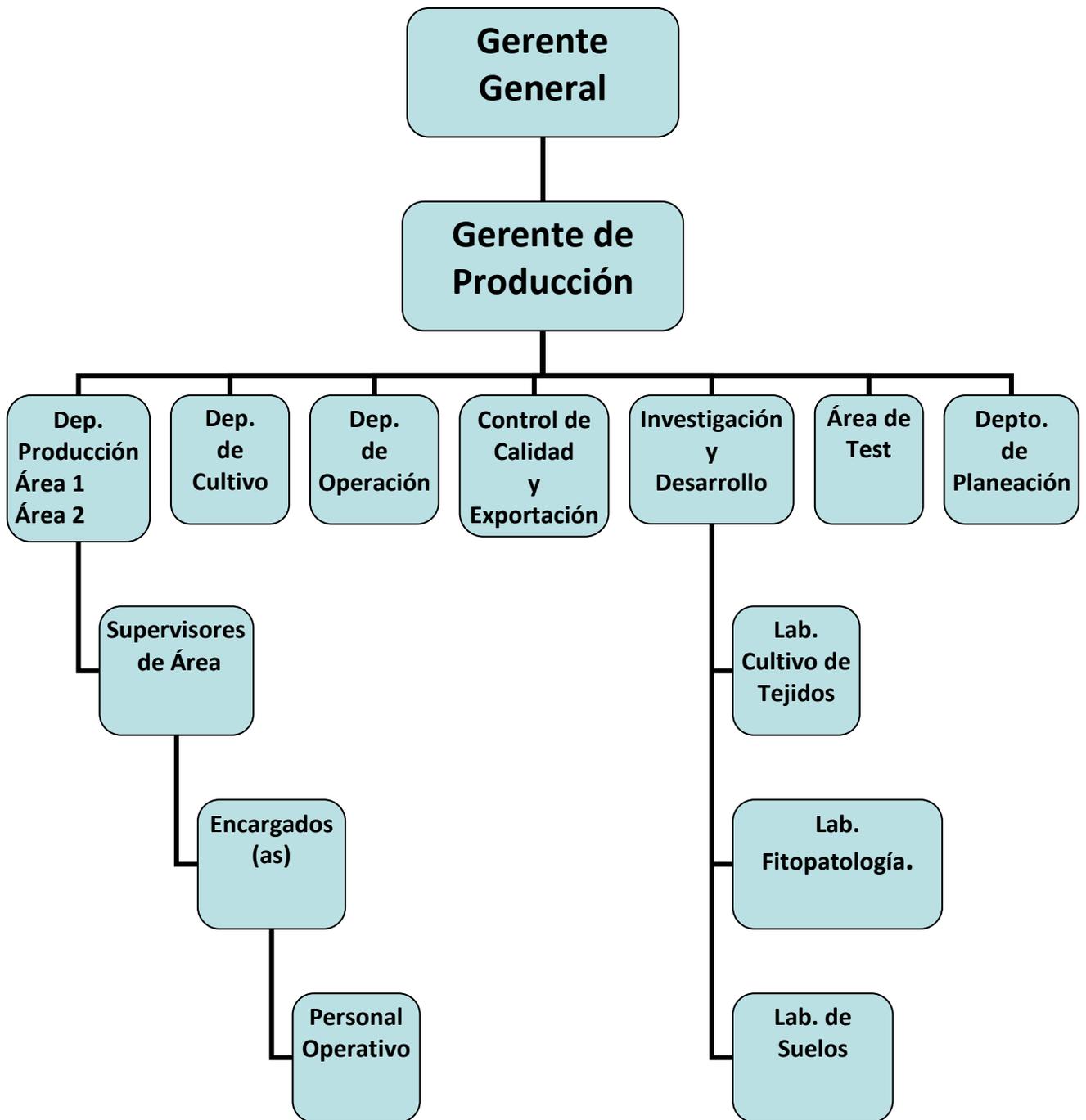


Figura 1. Organización General del área de Producción de la Empresa.

Fuente: Cedillo Gámez P.A.; en base a Organización de la Empresa

1.5.5 Generalidades de los Laboratorios

El departamento de investigación y desarrollo tiene a su cargo los laboratorios de Cultivo de Tejidos, Fitopatología y Suelos, estos laboratorios prestan sus servicios a la Empresa “Jardines Mil Flores S.A”.

Los laboratorios en orden de tamaño son

- Laboratorio de Cultivo de Tejidos
- Laboratorio de Fitopatología
- Laboratorio de Suelos

Los tres laboratorios son parte del departamento de “Investigación y Desarrollo”

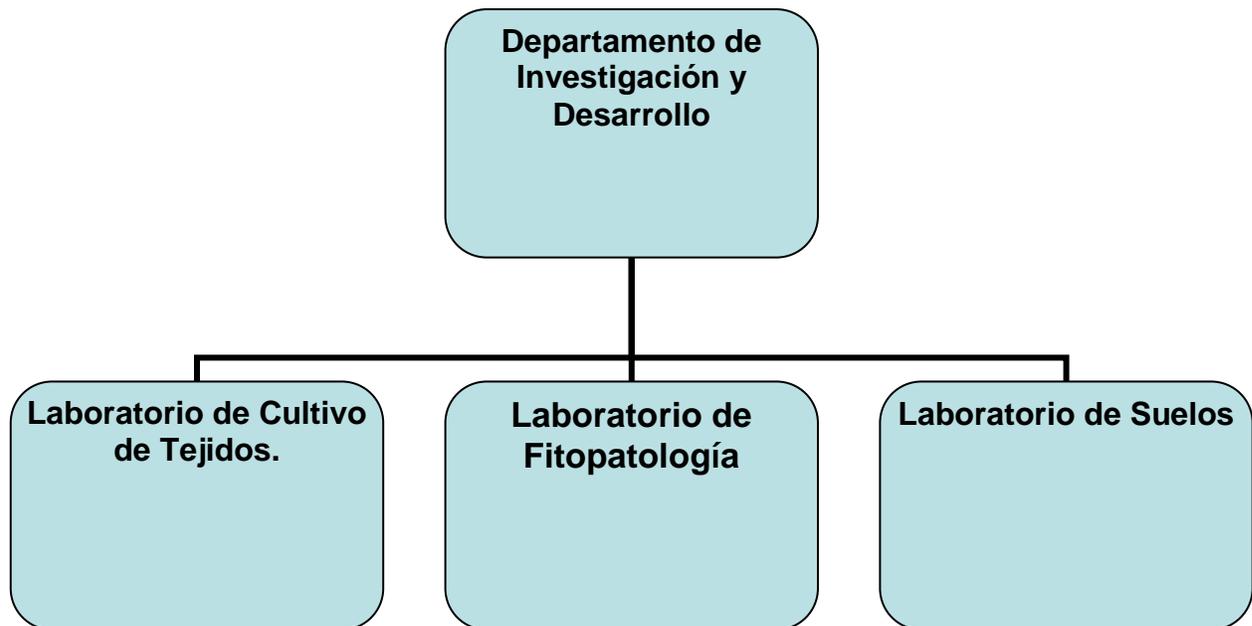


Figura 2. Organización del departamento de Investigación
Fuente: Cedillo Gámez P.A.; en base a organización actual del departamento

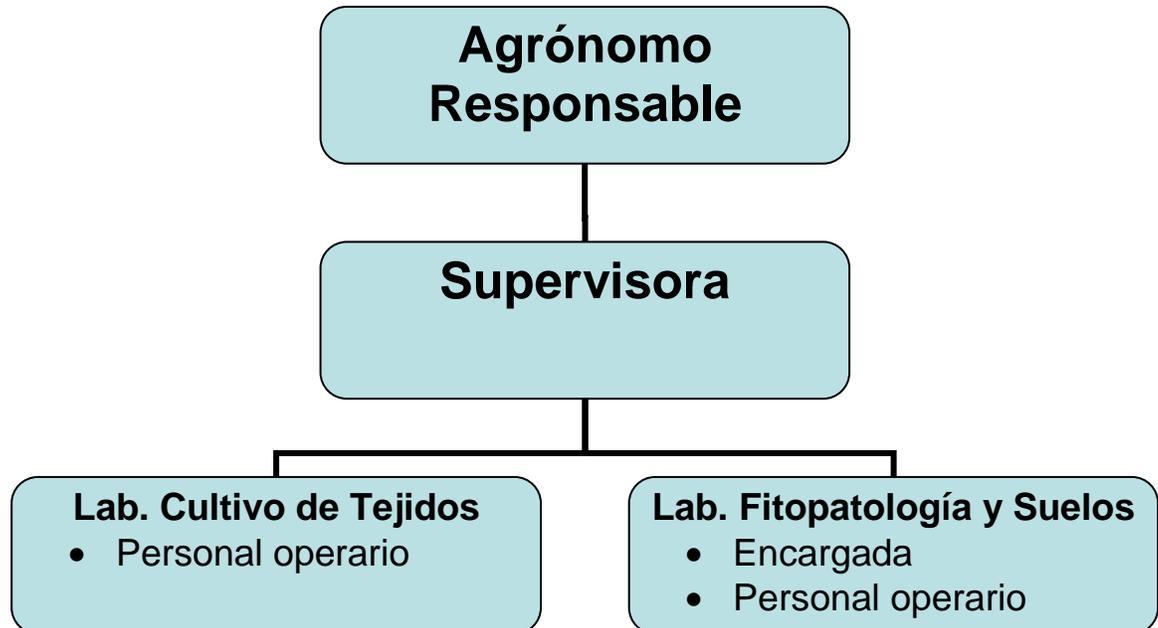


Figura 3. Organización interna de los laboratorios.
 Fuente: Cedillo Gámez P.A.; en base a organización actual del laboratorio

1.5.6 Laboratorio de Cultivo de Tejidos

a. Visión del laboratorio

Ser proveedor de material vegetal *in vitro* de excelente calidad a las unidades de producción tanto internas como externas a la corporación.

b. Misión del laboratorio

Propagar sistemáticamente todo el material vegetal con el que cuenta el laboratorio, con una excelente calidad, en un ambiente altamente higiénico, eficiente, amigable y de constante superación.

1.5.7 Actividades que se realizan en el laboratorio

El laboratorio de cultivo de tejidos, es el más grande en extensión y es el que cuenta con más personal, en este laboratorio se realiza fundamentalmente la actividad de micropropagación, las fases son:

Fase 0: Preparación del material vegetal: Aunque no está dentro de las etapas propias de la micropropagación es una de las más importantes, consiste en establecer un plan de aplicaciones de productos químicos al bloque madre, para garantizar, en la medida de lo posible, la sanidad de los explantes que serán llevados al laboratorio (López et al. 2001).

Fase 1: Iniciación: El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y limpios. El éxito lo determina la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (López et al. 2001).

Fase 2: Multiplicación o Propagación: El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación y destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación de los explantes (López et al. 2001).

Fase 3: Enraizamiento: En esta etapa se produce la formación de raíces. En algunas especies la formación de raíces es relativamente fácil. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de medios y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis. Y en el segundo caso variedad de sustratos (López et al. 2001).

Fase 4: Aclimatización de plantas: Esta etapa puede iniciarse desde el laboratorio, a esto se le llama aclimatización *in vitro*, esto implica algunas variaciones en las condiciones de las plantas previo a su aclimatización en los invernaderos, la aclimatización *ex vitro*, es una etapa importante, esta etapa se realiza en el invernadero, es en esta etapa donde la planta requiere de mayores cuidados, para asegurar su sobrevivencia (López et al. 2001).

1.5.8 Principales funciones del laboratorio

a. Proveer material vegetal *in vitro* a toda la empresa y en algunos casos al extranjero.

Dentro de las principales responsabilidades que tiene el laboratorio está la de proveer material vegetal *in vitro* a toda la empresa, con las características que indica en la Visión y Misión del laboratorio.

Proveer material vegetal de alta calidad es una gran responsabilidad, el personal del laboratorio y sus encargados se preocupan por mantener un ambiente higiénico, proporcionándole a las plantas el mejor ambiente para su adaptación *in vitro*.

Es responsabilidad también del laboratorio proveer un material vegetal que se adapte a las condiciones de invernadero o condiciones *ex vitro*. Por esto se cuenta con un protocolo de aclimatización de plantas provenientes de este laboratorio, este protocolo es útil para algunas especies ornamentales, sin embargo las necesidades de cada especie con que cuenta el laboratorio son muy diferentes.

b. Iniciación de plantas provenientes de los invernaderos para propagación en el laboratorio.

Este proceso consiste en la aplicación de productos químicos al bloque madre o donante, para garantizar en la medida de lo posible, la sanidad del material vegetal que será llevado al laboratorio.

El objetivo principal es establecer cultivos viables y limpios. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización del material vegetal.

c. Recepción de plantas *in vitro*.

En ocasiones se recibe material *in vitro* de otros laboratorios, algunos de ellos fuera del país, con la finalidad de propagarlo y satisfacer las demandas de producción, el personal del laboratorio se encarga de verificar la calidad y la cantidad de las plantas que se reciben, así como de darle las condiciones adecuadas y favorables para su desarrollo y multiplicación.

d. Mantenimiento de líneas

El laboratorio se encarga del mantenimiento de germoplasma en buenas condiciones para cuando se requiera en producción.

El material de mantenimiento, como todas las plantas del laboratorio se ubica el mismo cuarto de crecimiento, bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad.

1.5.9 Áreas del laboratorio

- **Lavandería:** en este lugar se realiza el lavado y secado de los uniformes que son utilizados a diario por el personal del laboratorio.
- **Bodega de materiales:** en la bodega se guardan los materiales para el uso diario de los laboratorios, en esta se encuentra: material de oficina, cristalería nueva, bolsas plásticas y material de limpieza, entre otros.
- **Oficina:** ésta cuenta con una vista panorámica de todo el laboratorio, desde ella se puede mantener el control de las actividades que se realizan en el.
- **Área de cambio:** en el área de cambio el personal deja sus pertenencias, en sus respectivos lockers, al momento de ingresar a esta área se deben lavar las manos y desinfectarlas antes de colocarse el uniforme.

- **Cuarto de Transferencia:** es el cuarto de mayor tamaño del laboratorio, en él se encuentran tres cámaras de flujo laminar, dos estantes metálicos para colocar el material vegetal de transferencia, utensilios y material necesario para transferencia.
- **Cuarto de Crecimiento 1:** en este se encuentra todo el material vegetal del laboratorio, en él hay varios estantes iluminados, ventilación y control de la temperatura para mantener en condiciones estándar a todas las plantas.
- **Cuarto de crecimiento 2:** en este hay estantes que se utilizan para colocar medios de cultivo, cristalería limpia, bandejas etc. Este cuarto no se utiliza para crecimiento de plantas aunque no se descarta la habilitación de una parte del cuarto para proveer a las plantas de otro tipo de condiciones.
- **Cuarto de preparación de medios:** como su nombre lo indica en este cuarto se preparan los medios de cultivo, que serán utilizados para las transferencias, en el se cuenta con:
 - Un refrigerador.
 - Balanza analítica,
 - Agitadores eléctricos.
 - Medidor de pH
 - Un horno microondas.
 - Un autoclave
 - Variedad de reactivos para la preparación de los medios.

1.5.10 Principales Normas del laboratorio

a. Reglas de ingreso

- No ingresar ningún tipo de alimento ni bebida al laboratorio.
- No ingresar al laboratorio si antes entró a un invernadero o a otro laboratorio.
- Quitarse los zapatos.
- Lavarse las manos.
- Asperjarse las manos con desinfectante.
- Colocarse el uniforme.

b. Normas de transferencia

- Desinfección de ambientes con etanol al 70% antes de iniciar.
- Limpiar las cámaras de flujo laminar con Etanol al 70%, para esto el personal debe colocarse guantes y mascarilla.
- Identificar y revisar el cultivo antes de la transferencia.
- No hablar en las cámaras de flujo laminar para evitar la contaminación.
- Sellar los tubos con parafilm antes de llevarlos al cuarto de crecimiento 1, hacerlo utilizando guantes y mascarilla.
- Si algún tubo está contaminado, llevarlo al laboratorio de fitopatología para evitar la contaminación dentro del laboratorio.

c. Normas de preparación y esterilización de medios

- Revisar las recetas y las cantidades que se prepararán antes de iniciar
- Limpieza y desinfección del área.
- El personal debe utilizar guantes y mascarilla.
- Identificar el recipiente de preparación, con el nombre del medio y la fecha de preparación, esto se hará también con los tubos o frascos que contengan el medio.

- Al ingresar la cristalería al autoclave revisar las normas de uso de la misma, especialmente las cantidades de medio, para que la esterilización sea efectiva.
- Al finalizar el uso del autoclave, se debe esperar a que la temperatura este alrededor de 70 °C y la presión baje a 0, cuando ya se ha llegado a los niveles deseados, se puede abrir el autoclave con precaución usando guantes, se puede sacar el medio de cultivo, el autoclave debe quedarse sin agua y secarla para evitar la formación de sarro.

1.5.11 Laboratorio de Fitopatología

a. Visión de los laboratorios

Proveer los análisis y diagnósticos fitopatológicos de excelente calidad confiabilidad a todos los usuarios de la corporación.

b. Misión

Analizar y diagnosticar todas las muestras que ingresen al laboratorio en un ambiente altamente higiénico, eficiente, amigable y de constante superación, con una excelente calidad, protocolos definidos, confiables y seguros.

1.5.12 Principales actividades del laboratorio

a. Test de *Alternaria* sp.

El laboratorio de fitopatología se encarga de realizar los test de *Alternaria* sp. en semillas de Mulata (*Zinnia elegans*) y Marigold (*Tagetes erecta*). Se cuenta con estándares de calidad que impiden la exportación de semillas con cualquier tipo de patógeno, en este caso especialmente *Alternaria* sp. en semillas de Mulata y Marigold. Las estrictas normas de calidad que exige la exportación, provocan riesgos de pérdidas económicas a la empresa, al no poder ofrecer a sus clientes de las variedades de las especies antes mencionadas ya que estas son severamente afectadas por el hongo.

b. Diagnóstico de enfermedades

El laboratorio tiene la responsabilidad de identificar hongos y bacterias que ocasionan enfermedades en las plantas provenientes de invernadero, para esto se cuentan con medios de cultivo especiales para el aislamiento y posterior identificación de estos.

c. Extracción de nematodos.

El laboratorio de fitopatología realiza análisis de nematodos en muestras vegetales y de suelo que proviene de los invernaderos, aunque la extracción de los nematodos se realiza en el laboratorio de suelos, el conteo e identificación de estos se hace en el laboratorio de fitopatología.

d. Análisis de hongos en suelo.

Este análisis como su nombre lo indica tiene la finalidad de identificar hongos fitopatógenos en el suelo de los invernaderos, la sanidad del suelo es un factor determinante para una mejor producción.

e. Evaluación *in vitro* de fungicidas

Estas evaluaciones se realizan mezclando dosis de agroquímicos en un medio de cultivo ácido, que se inocula con el hongo puro que se desea controlar, para posteriormente determinar cual mostro mayor eficacia.

f. Pruebas de patogenicidad.

Las pruebas de patogenicidad se hacen con la finalidad de determinar si un microorganismo fitopatógeno, puede ocasionar daños a determinadas especies, estas pruebas se hacen basándose en los postulados de Koch que son:

1. El agente debe estar presente en cada caso de la enfermedad en las condiciones apropiadas y ausente en las plantas sanas
2. El agente no debe aparecer en otra enfermedad de manera fortuita
3. El agente debe ser aislado del cuerpo en un cultivo puro a partir de las lesiones de la enfermedad.
4. El agente debe provocar la enfermedad en una planta susceptible al ser inoculado.
5. El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en las plantas de experimentación (Wikipedia 2011).

g. Diagnóstico de Virus

Los virus son parásitos obligados, de fácil transmisión y difícil diagnóstico, en el campo sus síntomas son confundidos muchas veces con deficiencias de nutrientes o problemas de riego, para realizar un diagnóstico adecuado se deben realizar pruebas rápidas a través de tiras indicadoras de marcas comerciales o a través de plantas indicadoras de virus haciendo inoculaciones mecánicas.

1.5.13 Áreas del laboratorio

El laboratorio de fitopatología no cuenta con áreas definidas como el laboratorio de Cultivo de Tejidos, podemos identificarlas de acuerdo al equipo que se encuentra en ellas.

- **Área de esterilización**

En esta se encuentra una autoclave, que es utilizada para la esterilización de tubos y frascos contaminados y para material de fitopatología.

- **Área recepción de muestras e incubación**

En ella podemos encontrar varios gabinetes en donde se guardan medios de cultivo, para crecimiento de hongos y bacterias.

- **Área de análisis y diagnóstico**

Es el área más grande del laboratorio podemos encontrar

- 1 balanza analítica.
- 1 agitador,
- 1 horno microondas
- 1 horno de convección
- 2 estereoscopios
- 2 microscopios
- Una pequeña cámara de refrigeración
- Reactivos para la preparación de medios.

- **Área de transferencias**

En ésta encontramos una cámara de flujo laminar.

1.6 Conclusiones y Recomendaciones

1.6.1 Laboratorio de Cultivo de Tejidos

a. Material vegetal *in vitro*:

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos tiene la responsabilidad de proveer material vegetal de alta calidad, que tenga buena adaptación a las condiciones *ex vitro*, actualmente se cuenta con un protocolo de aclimatización para todas las plantas que provienen del laboratorio, sin embargo no todas las especies tienen los mismos requerimientos, lo que ocasiona que no todas tengan un buen porcentaje de “pegue”.

Por lo que se hace necesario la elaboración de un protocolo que se adapte de mejor manera a los requerimientos de las especies que se encuentran en el laboratorio, esto con la finalidad de tener una mayor sobrevivencia en los invernaderos, haciendo que la propagación *in vitro* sea un proceso exitoso de principio a fin.

b. Iniciación de explantes:

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos cuenta con muchos métodos de desinfección de plantas, la combinación de desinfectantes y tiempos proporciona buenos resultados en determinadas especies, actualmente el laboratorio no cuenta con un protocolo de iniciación establecido, debido a que no todas las plantas responden de la misma manera a los agentes desinfectantes que se aplican, se hace necesario la elaboración de un protocolo de iniciación que estandarice un tratamiento, para la desinfección de las plantas que se desean introducir al laboratorio, los indicadores principales del éxito de un tratamiento, son la ausencia de contaminación y poco o ningún daño mecánico al material vegetal.

1.6.2 Laboratorio de Fitopatología

a. Identificación de *Alternaria* sp. en semilla de Zinnia

La calidad en cada uno de los procesos de producción de la semilla es determinante en la sanidad del producto final, la cantidad de tiempo y personal que se invierte en los test de *Alternaria* sp. en semilla de Zinnia (*Zinnia elegans*) podrían reducirse si la incidencia del patógeno fuese menor, lamentablemente la cantidad de semilla contaminada es tanta que satura de muestras el laboratorio de fitopatología.

Por lo que se considera importante involucrarse en cada uno de estos procesos productivos, para la elaboración de plan de manejo fitosanitario, iniciando con la identificación de la especie de *Alternaria* sp. que contamina la semilla.

b. Identificación y aislamiento de hongos

Son muchos los hongos que pueden ocasionar daño a los cultivos existentes en la empresa, debido a esto se considera importante la identificación, aislamiento y pruebas para de control de hongos.

Por medio de estas pruebas podremos identificar que hongos ocasionan pérdidas económicas y controlarlos con productos que encontramos en el mercado.

1. 7. Bibliografía

1. Barrientos, F. 2006. Etiología de la marchitez de la petunia (*Petunia hybrida* Vilm.), bajo condiciones de invernadero, en el municipio de Amatitlán, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 51 p.
2. López, VG; Grande, J; González, B. 2006. Guía para la elaboración de plan de diagnóstico en el Ejercicio Profesional Supervisado, Facultad de Agronomía, Guatemala (en línea). Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 15 p. Consultado 18 feb 2008. Disponible en http://cete.iespana.es/pub/plan_diagnostico_eps.pdf
3. López, A; García, M; Quintero, R; López-Munguía, A. Canales, Fases de la micropropagación. 2001. Biotecnología alimentaria. México, Limusa. 636 p.
4. Wikipedia.com. 2011. Postulados de Koch (en línea). España. Consultado 15 oct 2011. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/PostuladosdeKoch.html>

CAPÍTULO II

PROTOCOLO DE ACLIMATIZACIÓN *EX VITRO* PARA CUATRO ESPECIES DE ORNAMENTALES, EN LA EMPRESA “JARDINES MIL FLORES S.A”, AMATITLÁN, GUATEMALA C.A.

EX VITRO ACCLIMATIZATION PROTOCOL FOR FOUR ORNAMENTAL SPECIES IN THE COMPANY “JARDINES MIL FLORES S.A”, AMATITLÁN, GUATEMALA C.A.

2.1 Presentación

La aclimatización es la etapa final de un protocolo de micropropagación. Durante esta etapa las plántulas deben adaptarse a nuevas condiciones ambientales en invernaderos, para poder adaptarse a las condiciones de campo. El mal funcionamiento de las relaciones hídricas así como el pobre desarrollo del sistema fotosintético son las principales causas de la pobre supervivencia alcanzada en esta fase.

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa, es decir que la planta no realiza ningún esfuerzo por conseguir su propio alimento, las condiciones son controladas por lo que no tiene que desarrollar defensas hacia el ambiente.

Los cambios fenotípicos que son inducidos por las condiciones ambientales provocan que una gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante en las condiciones naturales, lo que hace necesario aplicar técnicas de aclimatación *in vitro* o *ex vitro* que garanticen un retorno gradual de las mismas a sus características morfológicas normales (Agramonte et al 1993).

De modo que, la terminología aclimatización implica la transición desde las condiciones *in vitro* a las *in vivo*, bajo la intervención y guía de la mano del hombre (Preece y Sutter 1991) consideran a las cualidades intrínsecas de las plantas, como el factor más importante y de éxito en el traslado de estas, de las condiciones *in vitro* a *in vivo*. Para la elaboración de un protocolo de aclimatización se tomaron en cuenta tres factores, que se consideran primordiales en el proceso de climatización de las plantas, estos son Intensidad lumínica, túneles y substratos. La elaboración de un protocolo confiable es determinante para la supervivencia de las plantas, esto afecta de manera positiva a la producción de ornamentas y otro tipo de plantas propagadas *in vitro*.

2.2. Definición del problema

La propagación *in vitro* tiene muchas ventajas sobre la agricultura convencional, como la alta tasa de multiplicación, crecimiento libre de plagas y enfermedades etc. Sin embargo la adaptación de estas plantas al ambiente es difícil, el cultivo *in vitro* altera algunas de las características morfológicas de las plántulas tales como la composición química de la capa epicuticular (Preecey Sutter 1990), la forma y distribución de los estomas (Ziv 1990), y la estructura de hojas y los tallos (Pierik 1987).

Las plantas propagadas *in vitro* tienen requerimientos climáticos diferentes, debido a que en su etapa de laboratorio las plantas, no activan completamente su aparato fotosintético. Una de las fases de la micropropagación y la que determina el éxito de todo el proceso es la fase de aclimatización, en esta fase se evalúan factores que influyen directamente en el desarrollo de las plantas, el éxito del proceso depende en gran parte del manejo que el hombre le dé a las plantas, para que la adaptación *ex vitro* sea exitosa se requiere de un protocolo confiable que satisfaga las necesidades de cada especie.

El laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa “Jardines Mil Flores S.A.” es el encargado de producir material vegetal de calidad, que se adapte en buena manera a las condiciones *ex vitro*, actualmente en el invernadero, existe un protocolo que es utilizado para todas las plantas que provienen del laboratorio, sin embargo no todas las especies tienen los mismos requerimientos climáticos, por lo que la respuesta de algunas especies no es uniforme al protocolo actual. Por ello el presente trabajo contribuirá con el desarrollo y empleo de técnicas que propicien una mayor eficiencia y calidad en la producción de las especies en estudio.

2.3. Marco teórico

2.3.1 Concepto de aclimatización

Se entiende por aclimatación el proceso de adaptación de una planta a un área o zona climática de la cual no es nativa, o a un microclima distinto al que ha tenido lugar en una fase previa al cultivo (Hoyos y Palma, 1995).

Poole y Conover (1983) citado por Mogollón (2002), señalaron que se acordó como término preferido “aclimatización” y no aclimatación. Esto se sustenta en “The American Heritage Dictionary of the English Language”, el cual describió el primer caso como la adaptación climática de un organismo, especialmente de una planta, que ha sido movida a un nuevo ambiente bajo condiciones controladas por el hombre y el segundo, el ajuste de un organismo a entornos naturales, es decir, que es un proceso natural.

2.3.2 Importancia de la aclimatización para el cultivo *in vitro*.

Este proceso es fundamental ya que el uso exitoso de la micropropagación de especies de importancia económica depende, en gran manera, de una adecuada aclimatización (Peñalver *et al.*, 1998; Mogollón 2003).

El establecimiento de plantas a condiciones *ex vitro* suele ser una limitante para el éxito de la micropropagación. El estrés hídrico de alta intensidad de luz va en detrimento en la sobrevivencia de las vitroplantas que son transferidas a un invernadero (Poole y Conover, 1983). Además de lo antes mencionado, el tiempo inmediatamente posterior al trasplante desde las condiciones *ex vitro*, las vitroplantas presentan baja capacidad fotosintética y alta susceptibilidad a la desecación debido al funcionamiento inadecuado de los estomas (Seon *et al.*, 2000), la reducción de las ceras epicuticulares (Grout, 1975; Sutter y Langhans, 1982) y el desarrollo deficiente de la cutícula (Brainerd y Fuchigami 1981).

A partir de los años 90, han sido desarrolladas técnicas de aclimatización para aumentar la sobrevivencia de las plántulas durante esta etapa. Estas buscan limitar la pérdida de agua que sufren las plántulas al ser trasplantadas al invernadero, ya sea mediante la modificación del ambiente externo al cual son transferidas, o mediante tratamientos directos a las plantas antes o después de su remoción del cultivo *in vitro* que normalicen su actividad fisiológica y su composición estructural.

Algunas de las técnicas utilizadas para modificar el ambiente externo son la reducción paulatina de la humedad relativa y el aumento gradual en la luminosidad (Preece y Sutter 1990).

Técnicas de aclimatización.

Para lograr la adecuada adaptación de las vitroplantas al ambiente *ex vitro* es necesario valerse de técnicas que proporcionen condiciones ambientales que gradualmente las “endurezcan”. De tal forma que, una vez finalizado este período las mismas presenten características que las faculten para crecer en el vivero. Entre estas resaltan el uso del propagador de neblina y la cámara húmeda en sus diferentes modalidades, las cuales pueden combinarse con tratamientos de endurecimiento durante la fase final de desarrollo *in vitro* (J. Torres, entrevista personal, Enero 27, 2008, citado por Nieto Lucena CA 2008).

2.3.3 Características de las plantas propagadas *in vitro*

El cultivo de tejidos altera algunas características morfológicas de las plántulas *in vitro* tales como la composición química de la capa epicuticular (Preece y Sutter 1990), la forma y distribución de los estomas (Ziv 1995), y la estructura de las hojas y los tallos (Pierik 1987).

También afecta características fisiológicas como la actividad estomática y la funcionalidad de las raíces y las hojas (Díaz-Pérez et al. 1995, Huylenbroeck y Debergh 1996, Chacón et al. 2000).

Estos cambios dificultan la capacidad de algunas plántulas para adaptarse a las condiciones externas, y por ello un número significativo de plantas micropropagadas no sobrevive la etapa de aclimatización (Preece y Sutter 1990).

Características anatómicas y morfológicas de las plantas propagadas *in vitro*

Las plantas procedentes del cultivo de tejidos, presentan un desenvolvimiento anatómico y fisiológico anormal, si se comparan con las propagadas tradicionalmente de forma natural (Debergh, 1991). De modo que, el término aclimatización implica la transición de *in vitro* a *in vivo*, bajo la intervención y guía de la mano del hombre. Preece y Sutter (1991) consideran a las cualidades intrínsecas de las plantas, como el factor más importante y de éxito en el traslado de estas, de las condiciones *in vitro* a *in vivo*.

Paques (1991) estima a la vitrificación o hiperhidratación como el síntoma más frecuentemente calificado con el adjetivo anormal, en torno al comportamiento de las plantas cultivadas *in vitro*. No obstante, existen ciertas características anatómicas que diferencian a las plantas cultivadas *in vitro* de las que se desarrollan en condiciones naturales; tales como hojas más pequeñas y finas, y pobre desarrollo del parénquima y de la cutícula con una considerable cantidad de espacios de aire en el mesófilo (Deberg, 1991).

Otra característica de las plantas obtenidas por cultivo de tejidos, es no ser fotoautotróficas; sino más bien mixotróficas o heterotróficas, pues los hidratos de carbono los toman del medio de cultivo y los cloroplastos se encuentran deprimidos. Estos factores afectan la fotosíntesis, la cual debe jugar un papel importante en la aclimatización y la supervivencia (Deberg, 1991).

La apertura y cierre estomático ha sido definida por el propio autor como el elemento de mayor implicación en la desecación o deshidratación de las plantas, llevadas a condiciones semi controladas procedentes del cultivo *in vitro*. Esto lo relaciona con el pobre funcionamiento de los estomas, el anormal desarrollo de las células oclusivas y a la poca selectividad en la acumulación de Na, K y Mg en dichas células durante el cultivo *in vitro*.

2.3.4 Control de las condiciones ambientales en la fase de aclimatización.

El mantener una alta humedad en los primeros días de la transferencia *ex vitro* es un factor crítico para la sobrevivencia de las vitroplantas, ya que por sus condiciones fisiológicas y anatómicas, son muy sensibles a presentar desequilibrio en el mecanismo estomático y en consecuencia, las células de las regiones más tiernas manifestaran estrés hídrico. De allí que una de las principales técnicas para la aclimatización es el utilizar sistemas que proporcionen alta humedad relativa y que permitan su reducción gradual hasta el final del proceso (Wetzstein *et al.*, 2002). Por la razón anterior, Trujillo *et al.* (1999) y Mogollón (2002) señalaron, que la mayoría de los invernaderos disponen de sistemas de nebulizadores, también denominados “mist” o “fog”, humidificadores o ambientes cerrados, que retienen vapor de agua como los túneles, tiendas, cámaras húmedas o cámaras de endurecimiento.

Las plantas cultivadas *in vitro* crecen a bajos niveles de luz, por lo que desarrollan hojas muy delgadas, y con alteraciones anatómicas y funcionales. Por tal motivo, ante estas condiciones, sufren clorosis y quemaduras (Mogollón, 2002).

Las vitroplantas son generalmente aclimatizadas durante 4 semanas a 90% de sombra. Esta reducción de la intensidad luminosa en condiciones de invernadero es un factor fundamental en los procesos de aclimatización (Riquelme *et al.*, 1991).

De acuerdo a lo señalado por Ziv (1995), durante las primeras dos semanas posteriores al trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente *in vitro*, hasta tanto que las plantas se adapten.

De esta forma se evita el exceso de transpiración de las plantas hasta que desarrollen un adecuado aparato estomático y la cutícula. El método más utilizado es el riego en forma de neblina, sin embargo, el incremento de la humedad beneficia el desarrollo de algunas algas y sobre todo de microorganismos, principalmente hongos, que afectan la sanidad de los cultivos.

Se han aplicado prácticas dirigidas al endurecimiento de las vitroplantas antes de la aclimatización, reduciendo la humedad relativa en los recipientes de cultivo e incrementando la intensidad luminosa a la que se exponen los mismos (Donnelly *et al.*, 1995), Mogollón (1995), reportó haber obtenido una sobrevivencia del 80 a 90% aclimatizando las vitroplantas de gerbera bajo nebulización durante dos semanas.

2.3.5 Factores ambientales dentro de los invernaderos y su influencia en las plantas

La ambientación o climatización de invernaderos implica el manejo de los factores y elementos climáticos dentro de las instalaciones, con la finalidad de recrear las condiciones óptimas o ideales para el desarrollo de los cultivos. Este manejo se realiza mediante una serie de estrategias, prácticas y equipos que permiten controlar la luminosidad, la temperatura y la humedad relativa en función de los requerimientos de los cultivos.

El desarrollo equilibrado de las plantas depende de que variables como luminosidad, temperatura, humedad, concentración de dióxido de carbono (CO_2) y de oxígeno (O_2), incidan favorablemente sobre los procesos fisiológicos. (Ferrato y Panelo 2003). A su vez, estos factores están íntimamente relacionados entre sí y actúan sobre el crecimiento vegetativo posibilitando la absorción por raíces de las soluciones del suelo, en condiciones de humedad óptima y temperatura controlada; favoreciendo la producción de elementos orgánicos por medio de la fotosíntesis; permitiendo la transpiración del vapor de agua excedente en la planta, cuando la humedad no es excesiva y la temperatura es la apropiada; facilitando la respiración óptima del vegetal en un medio provisto de oxígeno y valores normales de CO_2 (Ferrato y Panelo 2003).

Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes en el desarrollo de las plantas. Por eso, una de las principales ventajas de los invernaderos es la posibilidad de crear las condiciones climáticas que más acomoda a los cultivos, previniendo los daños por bajas temperaturas (Barrios 2005).

Cuando hay heladas se producen daños en los tejidos de las plantas. Para prevenirlas, es conveniente que el invernadero tenga doble cubierta y pueda quedar perfectamente cerrado para evitar el frío durante las noches.

Lo mismo ocurre cuando el rocío sobre las plantas se evapora muy rápido, a la salida del sol, y la temperatura ha bajado de 0° C. Esto se previene cuidando que no se moje la parte aérea de la planta al regar, y con una buena ventilación del invernadero. Así se evita que la evapotranspiración sature la atmósfera interior y se humedezca el follaje (Barrios 2005).

Pérdida del calor por irradiación. La temperatura del interior del invernadero, almacenada durante el día, baja en la noche. Este tipo de heladas se presenta en noches despejadas, sin vientos y con baja humedad relativa en el aire. Se evita utilizando polietileno térmico en la cubierta. Este conserva algunos grados más de temperatura por ser menos permeable a los rayos infrarrojos de onda larga.

Cuando el costo de los cultivos y cosechas lo justifique es conveniente, además, contar con equipos calefactores que produzcan una buena distribución del calor y que no provoquen contaminación por acumulación de gases (Barrios 2005).

Importancia de la luz para plantas

La energía solar radiante es el factor ambiental que ejerce mayor influencia sobre el crecimiento de las plantas. De ella depende la mayoría de los procesos biológicos, incluyendo la fotosíntesis, que es el proceso de conversión de la materia inorgánica en materia orgánica, constituyendo la base de todas las cadenas alimenticias de la tierra.

En este proceso, los rayos luminosos son absorbidos por los cloroplastos y utilizados como energía para la formación y asimilación de compuestos orgánicos complejos, a partir del CO₂, capturado por los estomas y de los elementos que la planta toma del suelo, los sustratos o la solución nutritiva, procesos en el que principalmente intervienen las raíces (Pacheco 2010).

Así, la energía luminosa es fundamental en varios procesos que realizan los vegetales. Además de los procesos foto energéticos y foto químicos, que conforman la fotosíntesis, también interviene en los procesos de movimiento y formación de las plantas, los tropismos, la orientación, el alargamiento del tallo, la formación de pigmentos y la clorofila (Alpi y Tognoni, 1999; Elías y Castillvi, 2001).

Al transformarse de energía luminosa en energía calorífica, la luz, interviene en todos los procesos bioquímicos de los vegetales. Así la luz actúa sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas verdes, como fuente energética para la asimilación fotosintética de CO₂, así como fuente primaria de calor y estímulo para la regulación del desarrollo de todos los tejidos vegetales (Alpi y Tognoni, 1999; Elías y Castillvi, 2001).

Cada especie vegetal requiere de una cantidad específica de radiación luminosa para desarrollar la fotosíntesis y expresar su potencial productivo. Si falta luz, las plantas tienden a alargarse y crecen con tallos y ramas débiles. Por el contrario, si una planta tiene más iluminación de la requerida, crecerá lentamente, presentará tallos duros, hojas arrocetadas y sus flores serán de colores pálidos. Dentro de un invernadero una cantidad excesiva de luz traerá como consecuencia temperaturas altas y baja humedad relativa, aumentando la transpiración de las plantas y el consumo de agua (Martínez, 2002).

Humedad ambiental del invernadero

La humedad relativa dentro de un invernadero interviene en varios procesos como; el amortiguamiento de los cambios de temperatura, el aumento o disminución de la transpiración, el crecimiento de los tejidos, la viabilidad del polen para obtener mayor porcentaje de fecundación del ovario de las flores y en el desarrollo de enfermedades y plagas. Cuanto más húmedo esté el ambiente, menos posibilidades existen de aumentar la evaporación y la transpiración de las plantas, a no ser que aumente la temperatura del ambiente. A mayor temperatura dentro del invernadero menor humedad relativa. A menor humedad relativa mayor consumo de agua (Pacheco 2010).

Cuando la transpiración es intensa, como consecuencia de la falta de humedad en el ambiente o por las altas temperaturas, puede ocurrir mayor concentración de sales en las partes donde se realiza la fotosíntesis y quedar disminuida esta función (Serrano, 2002).

La transpiración de las plantas se da por medio de los estomas, junto con el intercambio gaseoso y la asimilación del CO₂ atmosférico. Para ello las hojas deben mantener abiertos sus estomas y perder agua, si la pérdida de agua es elevada, cierran estomas y disminuye la asimilación de CO₂, disminuyendo la tasa de fotosíntesis.

Cuando la humedad relativa es elevada, el agua se condensa en la parte alta del invernadero, por adentro de la cubierta, provocando goteo sobre los cultivos y creando condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades. Humedad relativa alta y altas temperaturas son las condiciones ideales para el desarrollo de las enfermedades fungosa (Pacheco 2010).

Para evitar el goteo provocado por la condensación, actualmente ya se fabrican cubiertas de plástico con aditivos antigoteo, que hacen que el agua que se condensa en la parte superior escurra hacia los lados, donde es recolectada por canalillos colocados para ese fin (Pacheco 2010).

El agua también puede condensarse sobre los bordes de las hojas de las plantas, esto ocurre durante la noche cuando la humedad del aire es alta y la temperatura de las hojas es más baja que la temperatura del aire circundante.

La humedad relativa se puede controlar y aumentar mediante sistemas de evaporación de agua, como nebulizadores, micro aspersores y muros húmedos o regando agua en el piso para que se evapore, disminuya la temperatura y aumente el contenido de humedad relativa (Pacheco 2010).

2.3.6 El Sustrato

El término sustrato se aplica en Horticultura a todo material sólido, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, distinto del suelo *in situ*, que colocado en un contenedor en forma pura o en mezcla permite el anclaje del sistema radicular, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta (Blanc, 1987; Abad, 1991; Abad y Noguera, 1998). El sustrato puede intervenir (material químicamente activo) o no (material inerte) en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta.

La sustitución del cultivo tradicional en suelo por el cultivo fuera de suelo ha evolucionado, aumentando considerablemente la posibilidad de control de los factores de producción relacionados con el entorno radicular de la planta.

Además de la posibilidad de control, el cultivo en sustrato presenta otras características diferenciadoras respecto al cultivo en suelo. Así, Raviv *et al.* (1986), FAO (1990), Abad (1995), Abad y Noguera (1998), señalan las siguientes razones para sustituir el cultivo en suelo por el cultivo fuera de suelo:

1. La necesidad de transportar las plantas de un lugar a otro.
2. La existencia de factores limitantes para la continuidad de los cultivos intensivos en el suelo natural, particularmente salinización, enfermedades y agotamiento de los suelos agrícolas.
3. La fuerte intensificación cultural que facilita el cultivo hidropónico y en sustrato, al permitir un control riguroso del medio ambiente radicular, especialmente de los aspectos relacionados con el suministro de agua y de nutrientes.

Desde el punto de vista hortícola, la finalidad del sustrato de cultivo es producir una planta o cosecha de calidad y abundante, en el período de tiempo más corto posible y con los menores costes de producción (Abad *et al.*, 1993). Además, el sustrato utilizado no debe provocar un impacto medioambiental de importancia.

Materiales utilizados como sustratos

El sustrato de cultivo está constituido por un material poroso, en el que se desarrolla el sistema radicular de la planta, y del que ésta toma el agua y los nutrientes que necesita para su desarrollo y el oxígeno necesario para el funcionamiento correcto del sistema radicular. Para Michelot (1999), el soporte del cultivo (suelo o sustrato) cumple cuatro funciones:

- Asegura el anclaje mecánico de la planta
- Constituye la reserva hídrica de la que las raíces toman el agua para cubrir las necesidades de la planta
- Las raíces son órganos aerobios. El sustrato debe proporcionar el oxígeno que necesitan para su correcto funcionamiento.
- Finalmente, debe asegurar la nutrición mineral de la planta.

El cultivo en sustrato proporciona, en relación al cultivo en suelo, una mayor capacidad de control de los factores de producción relacionados con el sistema radicular de la planta. Esta mayor capacidad de control es posible por la reducción de la capacidad tampón del medio, debida por una parte a la reducción del volumen explorado por las raíces y por otra a las características propias de los materiales empleados como sustratos de cultivo. Son numerosos los materiales porosos que se pueden emplear para cubrir estas necesidades.

Las características que debe reunir el sustrato a emplear varían en función de las necesidades del material vegetal a utilizar (especie, variedad, si se trata de varias especies o de una sola, etc), del objetivo del cultivo (multiplicación, producción de planta, producción de fruto, (estructuras de protección del cultivo, sistemas de control de la solución nutritiva, sistemas de control de riego, etc), de la incidencia de factores no controlados por el agricultor (factores climáticos, posibilidad de fallos en los sistemas de control, etc).

Ante esta diversidad de necesidades, la diversidad de posibles materiales y de sus características proporciona la posibilidad de seleccionar el sustrato en función de las necesidades propias de cada explotación.

Desde el punto de vista de las características de la explotación y de las técnicas de producción, se presentan dos situaciones claramente diferenciadas: el cultivo hidropónico y la producción de planta de maceta o contenedor (Terés 2001).

2.4. Marco referencial

2.4.1 Localización del experimento

El experimento se llevó a cabo en uno de los invernaderos de la empresa “Jardines Mil Flores S.A” esta se localiza en el cantón Ingenio, del municipio de Amatitlán, departamento de Guatemala, a una distancia de 28.5 Kilómetros de la ciudad capital, teniendo acceso por la carretera CA-9 al pacífico, está ubicada geográficamente en las coordenadas, latitud Norte $14^{\circ}28'12''$, longitud Oeste $90^{\circ}37'45''$.

Su elevación sobre el nivel del mar es de 1,218 metros. La zona se caracteriza por una temperatura media de 22°C , con una precipitación media anual de 729.7 mm (Barrientos 2006). **(Figura 4)**

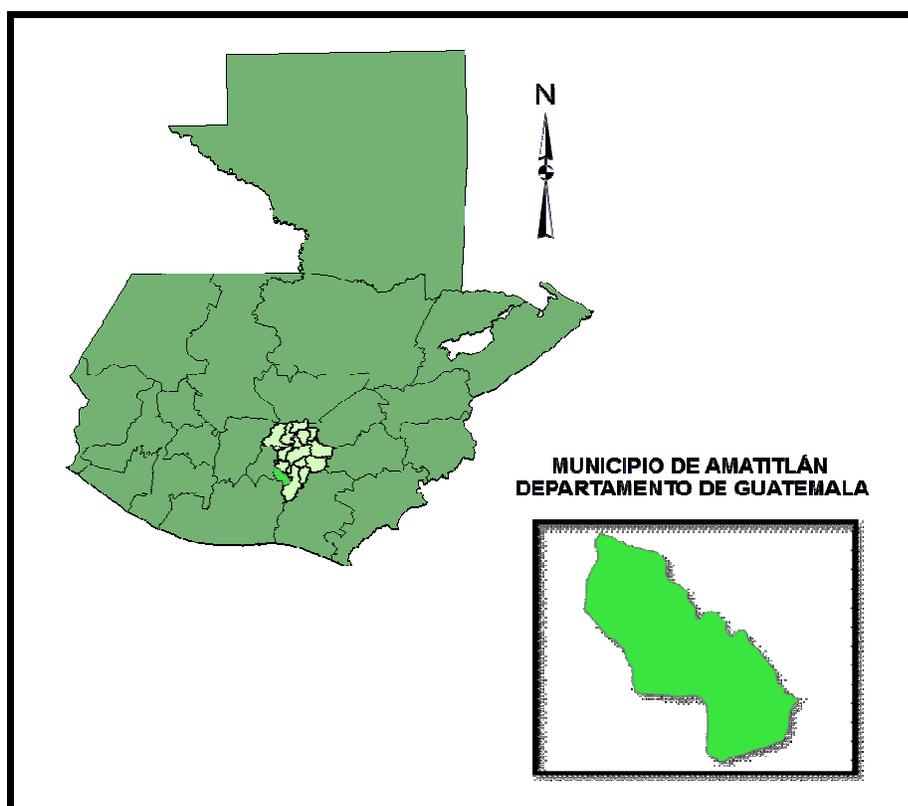


Figura 4. Localización del experimento

Elaborado por Cedillo Gámez P.A.

2.4.2 Material vegetal

Características de *Gazania* (*Gazania* sp.)

a. Taxonomía

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteracea

Género: *Gazania*

b. Generalidades

Hojas: las hojas de la *Gazania* son finas y muestran un color verde plateado.

Flores: las flores son parecidas a las de la margarita, pero de mayor tamaño. Además presenta una gran variedad de tonalidades diferentes.

Altura: alcanza como máximo una altura de unos 20 cm aproximadamente.

c. Cuidados

Luz: necesita un lugar soleado, si no, las flores no se abren. Las flores se cierran cada noche.

Temperatura: para climas suaves. Sólo aguanta heladas débiles (-5°C) y esporádicas. Muy sensibles a las heladas por lo que se aconseja extraerlas y guardarlas en interior durante el invierno.

Suelo: vive bien en cualquier terreno; aunque prefieren los ligeros.

Riego: no demasiado abundantes. Le perjudica el exceso de humedad, el riego debe ser frecuente en verano.

Abonado: durante la época templado-cálida es necesario añadir en el riego un abono mineral cada quince días. Para que florezcan continuamente hay que retirar las hojas y las flores marchitas.

Tiempo de vida: tiene una vida corta. Envejece a los 4-5 años, debiendo renovarse, por ejemplo, por esquejes en otoño.

Multiplicación: se multiplica por semillas a principios de primavera/finales de invierno.

Época de siembra: en la práctica se está haciendo todo el año.

Germinación: en 7-14 días a 18-20°C. (Fuente: Infojardin)

Características de Verbena (*Verbena hybrida*)

a. Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Verbena* (Fuente: Infojardin)

b. Características de la planta

Hojas: son usualmente opuestas, simples, y en muchas especies pilosas, frecuentemente densamente.

Flores: pequeñas, blancas, rosa, púrpuras o azules, con cinco pétalos, en densas agrupaciones.

Altura: entre 30-50 cm de altura.

c. Cuidados

Cultivo: herbáceas planta anual y perennes o semileñosas con cerca de 250 especies.

Luz: pleno sol, aunque soporta estar en semisombra.

Temperaturas: el clima debe ser benigno, si hace frío en invierno se muere. Puede resistir hasta -7°C .

Suelo: bien drenado.

Riego: basta con regarlas una vez por semana. Una vez establecidas soportan cierta escasez de agua.

Época de floración: la última parte de la primavera y a lo largo del verano.

Podar: al finalizar el verano debe podarse para que florezca más temprano en la próxima temporada.

Plagas y enfermedades de Verbena: es resistente a las plagas de jardín, pero hay que controlar el exceso de riego pues favorece la aparición de hongos de pudrición (Fuente Infojardin).

Características de Vinca (*Catharanthus roseus*)

a. Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Apocynaceae

Género: *Vinca l.* (Fuente: Infojardin)

b. Características de la planta

Hojas: oblongoobtusas, pecioladas, de color verde oscuro y brillantes, glabras.

Flores: axilares de color rojo (o bien blancas con el cuello de color rojo o verde), grandes, con lóbulos obovados. Las variedades más recientes han incorporado los nuevos colores rojos y salmones, manteniendo los tradicionales colores blancos con ojo y rosa lila. Sus pétalos son triangulares más grandes y solapados, formando un disco completo de color que hacen que las flores parezcan más grandes.

Altura: 20-40 cm, según variedad.

c. Cuidados

Cultivo: planta originariamente perenne, pero que ha sido cultivada como anual.

Luz: sol o semisombra al aire libre; bien iluminada si la planta se conserva en interiores. En verano evitar el sol directo y en primavera, otoño e invierno, en la calle, que le dé el sol.

Temperaturas: en invierno, si el termómetro baja de 5° C, conviene meterla en casa para protegerla.

Humedad: en verano es bueno pulverizar las hojas, pero las flores no.

Suelo: con un buen drenaje para no producir encharcamientos.

Riego: en verano casi todos los días; en primavera y otoño, cada 2 ó 3 días, según como esté el tiempo, y en invierno, regar muy poco.

Abonos: abonar con un fertilizante para plantas de flor.

Multiplicación: si es por semilla debe efectuarse a finales de invierno/ primavera. Germina en 10-20 días a 18-24°C (Fuente Infojardin)

Características de Clavellina (*Dianthus deltoides*)

a. Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Caryophyllaceae

Género: *Dianthus* (Fuente: Infojardin)

b. Características de la planta

Hojas: verde oscuro bronceado, persistentes.

Flores: generalmente solitarias, de color rosa intenso con manchas pálidas y una banda basal oscura. Florece de finales de primavera a principios de otoño. Flores rosas, rojas o blancas

c. Cuidados

Suelo: con buen drenaje. Resiste la cal.

Luz: sol o semisombra en climas calurosos.

Riego: normal.

Multiplicación: división, semilla o esqueje (Fuente Infojardin).

2.5 Objetivos

General

Elaborar un protocolo de aclimatización para cuatro especies de ornamentales mediante la evaluación de los factores: intensidad lumínica, túneles y sustratos.

Específicos

Determinar el efecto de la interacción de los factores intensidad lumínica, túneles o cubiertas y sustratos sobre el porcentaje semanal de sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatización.

Determinar el efecto de la interacción de los factores intensidad lumínica, túneles o cubiertas y sustratos sobre el peso fresco, peso seco de raíces y follaje a los 21 días de la siembra.

2.6 Metodología

2.6.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas con arreglo factorial.

Parcela grande: Incluye los factores intensidad lumínica y tamaño de los túneles.

Parcela pequeña: Sustratos.

2.6.2 Descripción de los factores

Cuadro 1. Factores evaluados

Factor	Niveles
Intensidad lumínica	Plástico transparente 1800 pies candela
	Plástico pigmentado 1200 pies candela
Túneles	Túnel de arco alto (1 m. de altura)
	Túnel de arco bajo (40 cm. de altura)
Sustratos	100% Arena volcánica de 1/8 de pulgada
	90 % Arena volcánica de 1/8 de pulgada + 10 % de Turba rubia sin fertilización, marca comercial.

Fuente: Datos recopilados por Cedillo Gámez, P.A.

2.6.3 Tratamientos

El experimento consistió en ocho tratamientos, estos son combinaciones de los niveles: tipo de plástico, altura de túnel y sustrato, la descripción de los tratamientos se presenta en el cuadro 2.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos

No. de tratamiento	Descripción
Tratamiento 1	Plástico pigmentado, túnel de arco alto, sustrato 100% arena volcánica de 1/8´.
Tratamiento 2	Plástico pigmentado, túnel de arco alto, sustrato 90% arena volcánica de 1/8´ + 10% de Turba rubia comercial sin fertilización.
Tratamiento 3	Plástico pigmentado, túnel de arco bajo, sustrato 100% arena volcánica de 1/8´.
Tratamiento 4	Plástico pigmentado, túnel de arco bajo, sustrato 90% arena volcánica de 1/8´ + 10% de Turba rubia comercial sin fertilización.
Tratamiento 5	Plástico transparente, túnel de arco alto, sustrato 100% arena volcánica de 1/8´.
Tratamiento 6	Plástico transparente, túnel de arco alto sustrato 90% arena volcánica de 1/8´ + 10% de Turba rubia comercial sin fertilización.
Tratamiento 7	Plástico transparente, túnel de arco bajo, sustrato 100% arena volcánica de 1/8´.
Tratamiento 8	Plástico transparente, túnel de arco bajo, sustrato 90% arena volcánica de 1/8´ + 10% de Turba rubia comercial sin fertilización.

Fuente: Datos recopilados por Cedillo Gámez, P.A.

2.6.4 Modelo estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

- Y_{ijkl} = Porcentaje de sobrevivencia de las plantas y peso fresco y seco de raíces a los 21 días a partir de la siembra.
- μ = Media general.
- α_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor intensidad lumínica.
- β_j = Efecto del j –ésimo nivel del factor Túneles o cubiertas.
- γ_k = Efecto del K -ésimo nivel del factor sustratos de enraizamiento.
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor intensidad lumínica, con el j -ésimo nivel del factor túneles o cubiertas, que es utilizado como residuo de parcelas grandes y es representado por el Error (a).
- $(\alpha\gamma)_{ik}$ = Efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor intensidad lumínica con el K -ésimo nivel del factor sustratos.
- $(\beta\gamma)_{jk}$ = Efecto de la interacción del j -ésimo nivel del factor túneles o cubiertas con el K -ésimo nivel del factor de sustratos.
- ε_{ijkl} = Error experimental asociado a la Y_{ijk} , utilizado como residuo a nivel de parcela pequeña, y definido como Error (b).

2.6.5 Unidad experimental

Para las cuatro especies de la investigación, las unidades experimentales estaban constituidas por cinco plantas, con tres repeticiones, para tener quince plantas por tratamiento.

2.6.6 Variables respuesta

Estas variables se determinaron tomando en cuenta las necesidades de la empresa y sus criterios para determinar el éxito de la aclimatización.

- a. Peso fresco, seco y porcentaje de humedad de raíces y follaje a los 21 días de la siembra.
- b. Sobrevivencia a las tres semanas.

2.6.7 Manejo del experimento

Obtención de material vegetal

a. **Selección de Material Vegetal:** Cuatro especies de plantas ornamentales entre las que se encuentran:

- Gazania (*Gazania* sp)
- Verbena (*Verbena hybrida*)
- Vinca (*Catharanthus roseus*)
- Clavellina (*Dianthus deltoides*)

b. **Plantas enraizadas:** todas las plantas utilizadas en el experimento, fueron previamente enraizadas, previo a llevarlas al invernadero, se sacaron de los tubos de ensayo y se les retiro cuidadosamente el medio de cultivo.

Aleatorización de las repeticiones.

a. Antes de trasladar las plantas al invernadero se realizó la aleatorización de las bandejas que representan una repetición, para identificar la ubicación de estos dentro del invernadero se elaboró un croquis.(**Ver anexo 1**)

b. Las plantas se trasladaron en bolsas plásticas envueltas en papel mayordomo humedecido, las bolsas se rotularon con el nombre de la especie, y el número de bandeja en el cual debería ser sembrado (**Figura 5**).

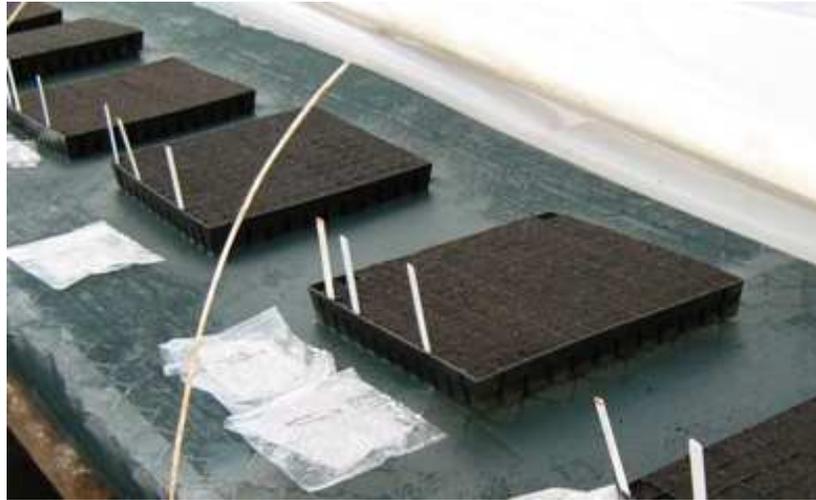


Figura 5. Las plantas se trasladaron envueltas en papel mayordomo humedecido dentro de bolsas plásticas.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

2.6.8 Aclimatización de plantas

La aclimatización de las plantas se realizó en uno de los invernaderos de la empresa, a este invernadero llegan todas las plantas producidas *in vitro*, por lo que se consideraba el lugar idóneo para desarrollar el experimento.

Materiales

- Dos túneles de arco alto, uno de plástico transparente y uno de plástico pigmentado. (ver Anexo 1 Croquis del experimento)
- Dos túneles de arco bajo uno plástico transparente y uno de plástico pigmentado.
- Dos bancas bajo sarán.
- 48 bandejas de 144 agujeros para todo el experimento.
- Arena volcánica de 1/8 de pulgada tratada en caldera.
- Turba rubia, sin fertilización.
- Tijeras para podar.

- 200 etiquetas plásticas para identificar las repeticiones en cada uno de los tratamientos.
- Desinfectante para limpiar las tijeras de podar.

2.6.9 Procedimiento en el invernadero

a. Arreglo de los tratamientos en el invernadero

Los tratamientos fueron ubicados en el área preparada especialmente para plantas provenientes del laboratorio de cultivo de tejidos, en el lado B del invernadero, bajo sarán (**Figura 6**), a la vez se colocaron dos ventiladores con la finalidad de evitar el sobrecalentamiento del área. (**Figura 7**).



Figura 6. Área aislada para fase de aclimatización.

Figura 7. Túneles cubiertos por sarán, colocados sobre bancas de concreto

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008



Figura 8. El área para aclimatización, contaba con ventilación y sombra, para evitar daño por los rayos directos del sol.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

b. Limpieza del área

Antes de colocar las bandejas sobre los camastrones de los túneles se debe limpiar el área.

c. Ubicación de bandejas

Las bandejas previamente aleatorizadas se colocaron en los túneles, en cada túnel se colocaron seis bandejas identificadas con etiquetas plásticas de acuerdo al croquis (ver anexo 2). Tres con 100% arena volcánica de 1/8 de pulgada y tres con 90% arena volcánica de 1/8 de pulgada y 10% con turba rubia sin fertilización (**Figura 9**), antes de la siembra se humedeció el sustrato (**Figura 10**).

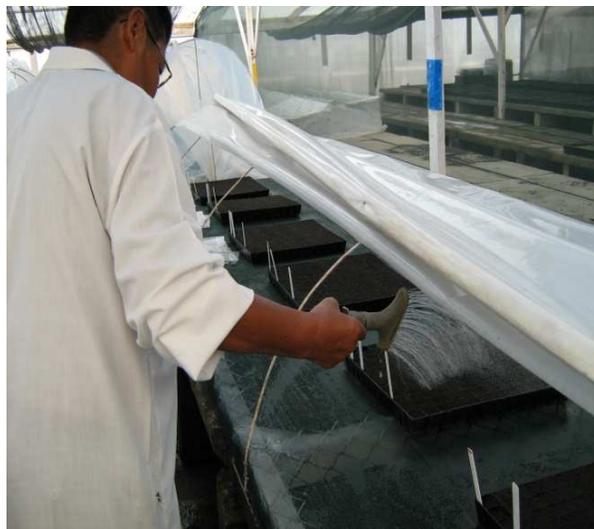


Figura 9. (Derecha) Las bandejas colocadas dentro de los túneles de acuerdo al orden de los tratamientos.

Figura 10. (Izquierda) Previo a la siembra, se humedecieron los sustratos.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

d. Siembra de las plantas

Ya ubicadas las bandejas e identificadas se procedió a la siembra de las plantas, ya que las plantas sufren estrés al salir del laboratorio, la siembra debe realizarse rápidamente, por lo que una de las encargadas colaboró en esta actividad.

(Figura 11).



Figura 11. Siembra de las plantas en bandejas previamente humedecidas.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008.

e. Tiempo de las plantas en los túneles

Las plantas se mantuvieron por dos semanas en los túneles, a partir del segundo día se levantó una parte del plástico de los túneles, esto con la finalidad de que la planta estuviese mas en contacto con el ambiente circundante, se levantaba a las 7:15 a.m. y se bajaba a las 4 p.m. en todos los túneles, a partir de los 12 días se levantaban las dos partes del plástico.

f. Neblina de las plantas

Las plantas deben ser humedecidas durante todo el proceso de aclimatización esto se hace aproximadamente cada hora, para esto se utiliza una neblina ya que el riego con una gota gruesa daña las plantas.

g. Plantas fuera del túnel

Al momento de completar las dos semanas en los túneles las bandejas se trasladaron al lado "A" del invernadero, que es la parte más alta de este, bajo sarán, en este lugar las plantas se encontraban en un ambiente menos controlado. **(Figura 12).**



Figura 12. Plantas fuera de túneles.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

2.6.10 Toma de datos

Los datos de porcentaje de sobrevivencia se obtuvieron realizando un conteo de las plantas sobrevivientes en cada bandeja durante las semanas dentro de los túneles y la semana que estuvieron fuera de estos, el peso fresco y seco de las raíces al igual que el peso fresco y seco de follaje, a los 21 días de iniciada la prueba.

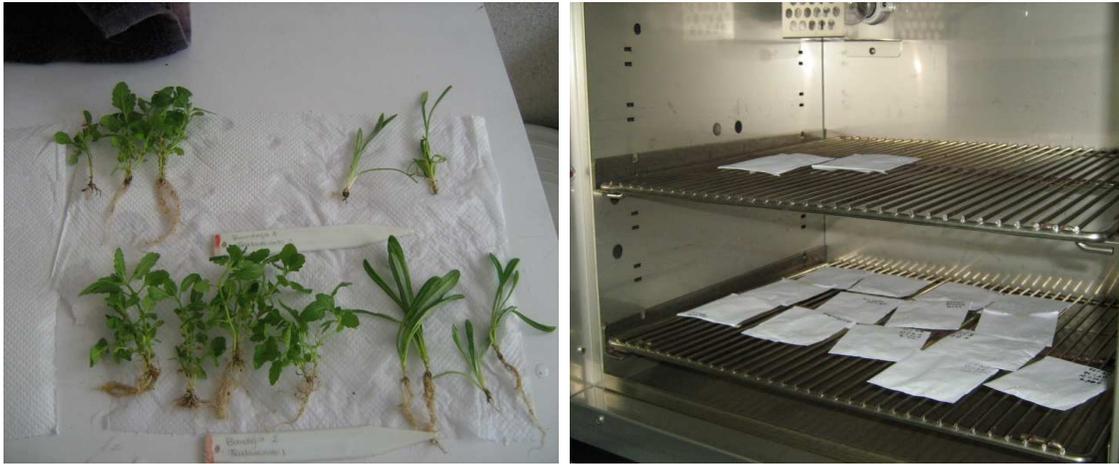


Figura 13. Las plantas lavadas y colocadas en el horno.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

2.7 Resultados

2.7.1 Altura de túnel

Cuadro 3. Resultados de peso fresco de raíz y de follaje, con respecto a la altura de túnel.

Especie	Peso fresco de raíz (g)		Diferencia mínima significativa	P-value	Peso fresco de follaje (g)		Diferencia mínima significativa	P-value
	Alto	Bajo			Alto	Bajo		
Gazania	0.08321	0.08317	0.031	Ns	0.6928	0.8283	0.2435	Ns
Verbena	0.08295	0.08003	0.0243	Ns	0.34167	0.38975	0.092	Ns
Clavellina	0.02133	0.01833	0.0095	Ns	0.19875	0.1875	0.0477	Ns
Vinca	0.09267	0.08533	0.0407	Ns	0.44842	0.43283	0.0896	Ns

Cuadro 4. Resultados de sobrevivencia a las 3 semanas con respecto a la altura

Especie	Sobrevivencia en semana 3		Diferencia mínima significativa	P- value
	Alto	Bajo		
Gazania	4	4	0.6842	Ns
Verbena	3	3	0.9008	Ns
Clavellina	4	4	0.9179	Ns
Vinca	4	4	0.77	Ns

Ns = Diferencia no significativa.

** = Diferencia Significativa.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

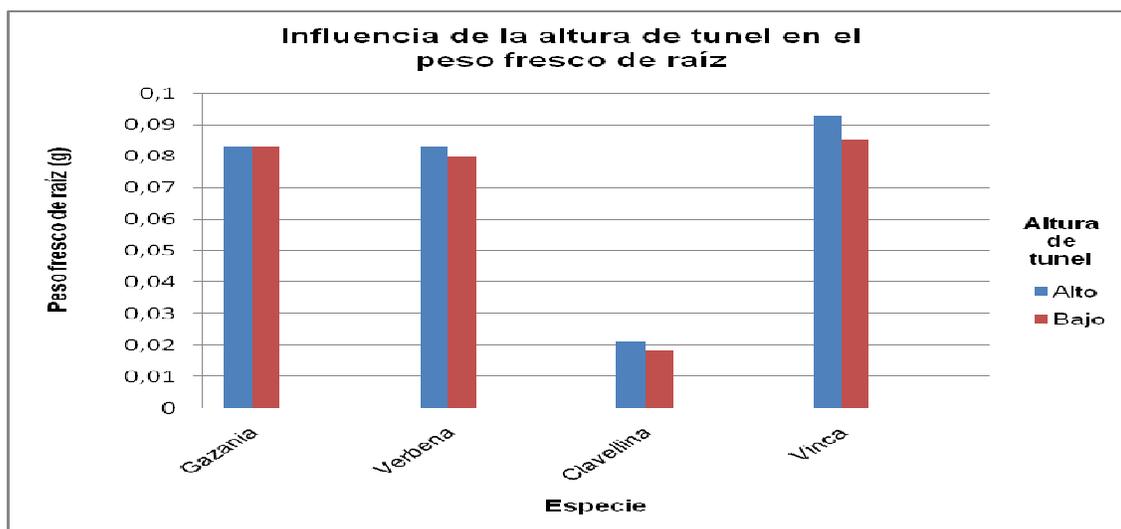


Figura 14. Gráfico de influencia de la altura de túnel en el peso fresco de raíz de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.3

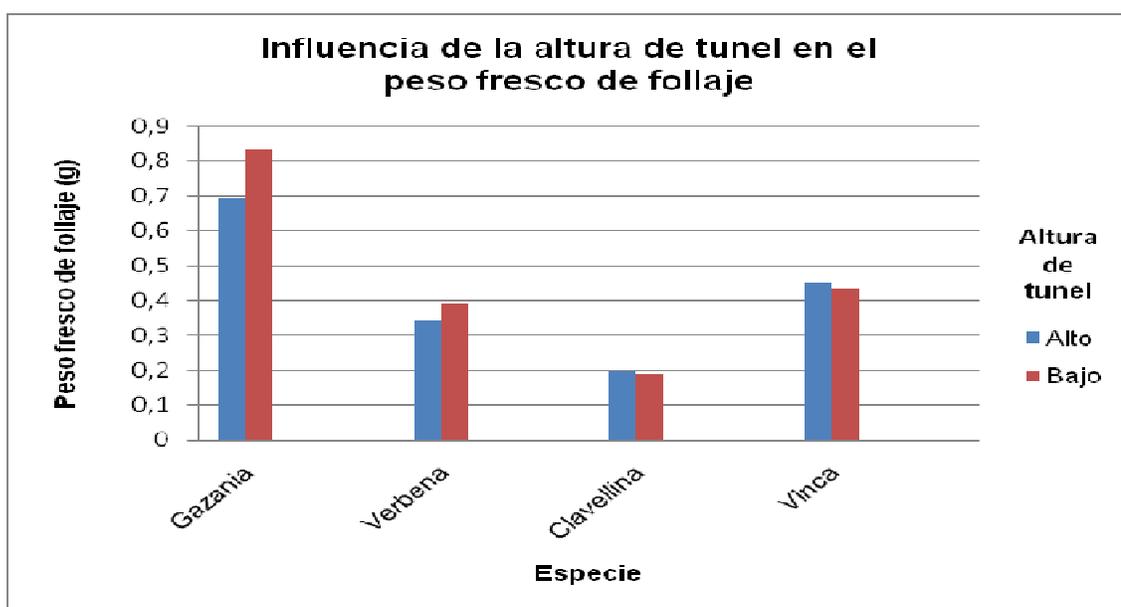


Figura 15. Gráfico de la altura de túnel en el peso fresco de follaje de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

En base a los datos del cuadro No.3 No se determinó diferencia significativa en cuanto a la influencia del túnel alto o bajo sobre el peso fresco de raíz y de follaje, debido a que el túnel bajo representa menor inversión en material para su construcción se recomienda su uso en la aclimatización de las especies.

Cuadro 5. Resultados de peso seco de raíz, follaje y sobrevivencia a la tercer semana con respecto a la altura de Túnel.

Especie	Peso seco de raíz (g)		Diferencia mínima significativa	P-value
	Alto	Bajo		
Gazania	0.0087	0.008692	0.0032	Ns
Verbena	0.008117	0.006967	0.0023	Ns
Clavellina	0.00367	0.00333	0.0012	Ns
Vinca	0.008667	0.008917	0.0034	Ns
Especie	Peso seco de follaje (g)		Diferencia mínima significativa	P- value
	Alto	Bajo		
Gazania	0.049567	0.051842	0.0115	Ns
Verbena	0.038142	0.038833	0.0078	Ns
Clavellina	0.02525	0.024	0.0058	Ns
Vinca	0.045333	0.04175	0.007	Ns

Ns=Diferencia No significativa

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

** = Diferencia Significativa.

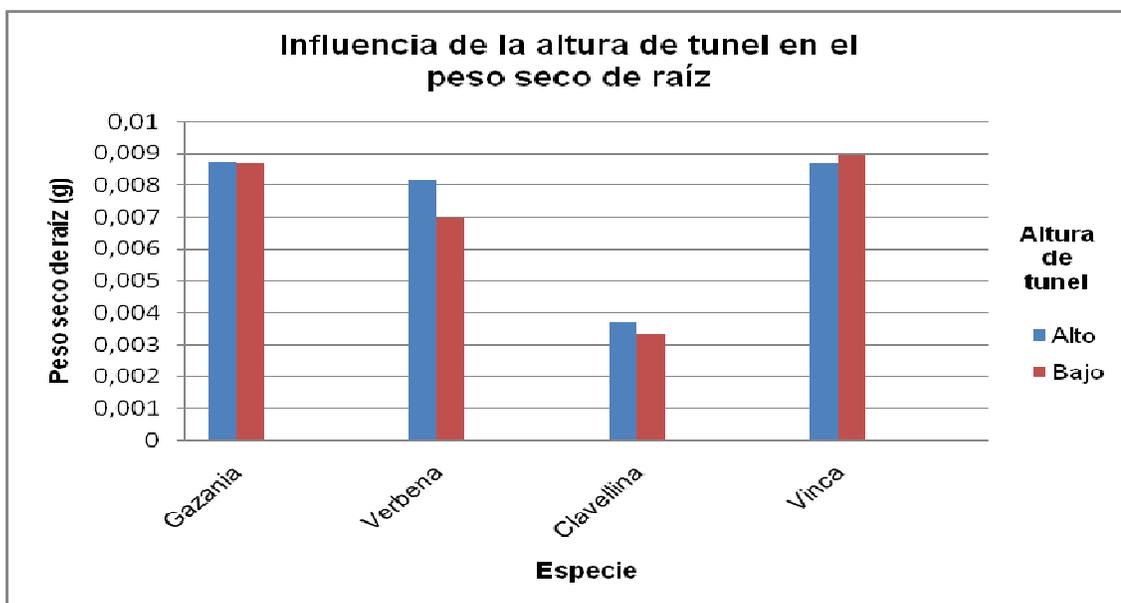


Figura 16. Gráfico de influencia de la altura de túnel en el peso seco de raíz de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.5

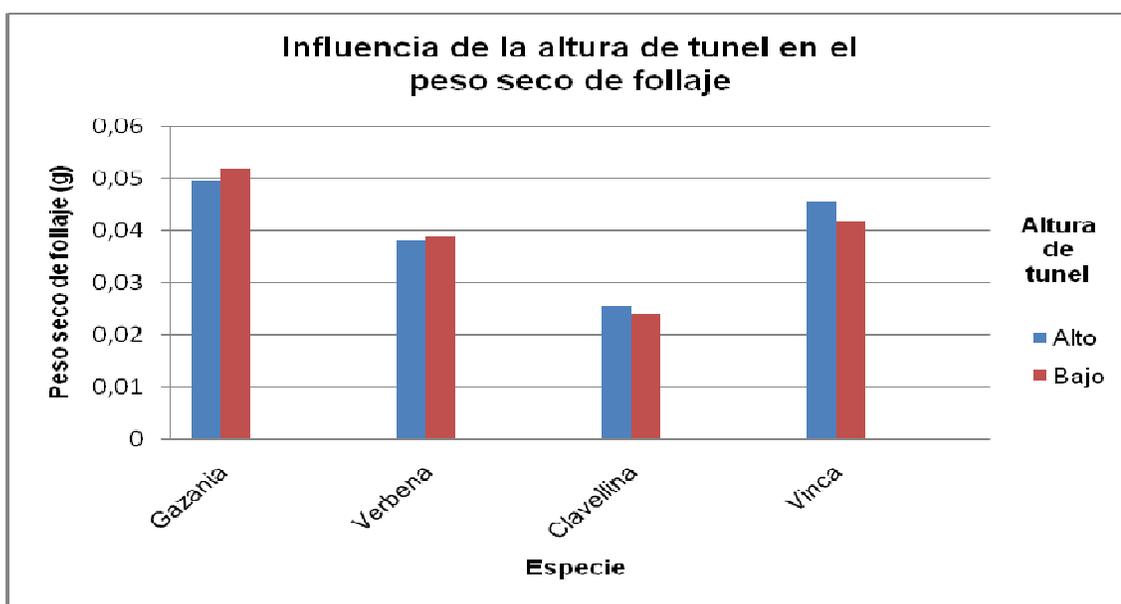


Figura 17. Gráfico de influencia de la altura de túnel en el peso seco de follaje de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).

Fuente: Cedillo Gámez, PA. en base a los datos del cuadro No.5

En base a los resultados del cuadro No.5. Con respecto a la altura de túnel y su influencia en el peso seco de raíz y de follaje se no se muestra diferencia significativa en los pesos de ninguna de las cuatro especies, por lo que es más factible el uso de túnel de arco bajo debido a que se utilizan menos materiales para su construcción.

2.7.2 Intensidad lumínica (tipo de plástico)

Cuadro 6. Resultados del peso fresco de raíz y follaje y sobrevivencia a la tercera semana con respecto al tipo de Plástico.

Especie	Peso fresco de raíz (g)		Diferencia mínima significativa	P-value	Peso fresco de follaje (g)		Diferencia mínima significativa	P-value
	Pigm	Trans			Pigm	Trans		
Gazania	0.07128	0.09510	0.031	Ns	b 0.6314	a 0.8898	0.2435	**
Verbena	0.07176	0.09122	0.0243	Ns	b 0.31117	a 0.42025	0.092	**
Clavellina	0.02333	0.01633	0.0095	Ns	0.19383	0.19242	0.0477	Ns
Vinca	0.07592	0.10208	0.0407	Ns	0.41833	0.46292	0.0896	Ns

Cuadro 7. Resultado de sobrevivencia a la tercera semana con respecto al plástico

Especie	Sobrevivencia en semana 3		Diferencia mínima significativa	P- value
	Pigm	Trans		
Gazania	4	4	0.6842	Ns
Verbena	3	3	0.9008	Ns
Clavellina	4	4	0.9179	Ns
Vinca	4	4	0.77	Ns

Ns = Diferencia No significativa

Fuente: Cedillo Gámez, P.A. 2008

** = Diferencia Significativa.

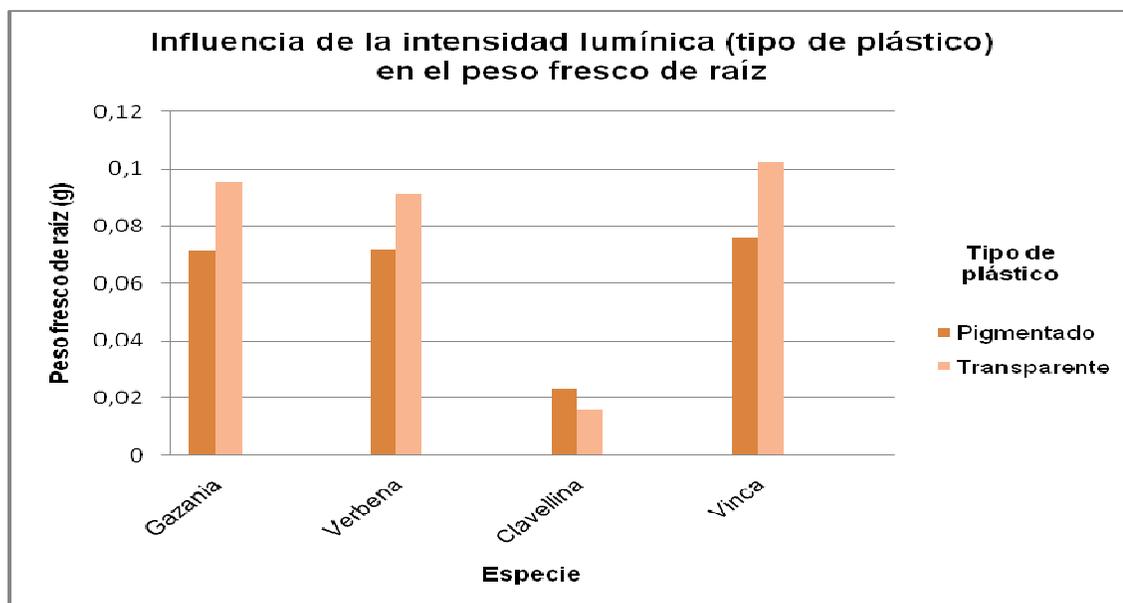


Figura 18. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso fresco de raíz de las 4 especies en estudio.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.6

De acuerdo a los resultados observados en el gráfico No 18. En cuanto al peso fresco de raíz no se observa diferencia significativa, entre el uso de plástico pigmentado o transparente, debido a los resultados obtenidos en tres de la cuatro especies en estudio es más factible el uso del plástico transparente.

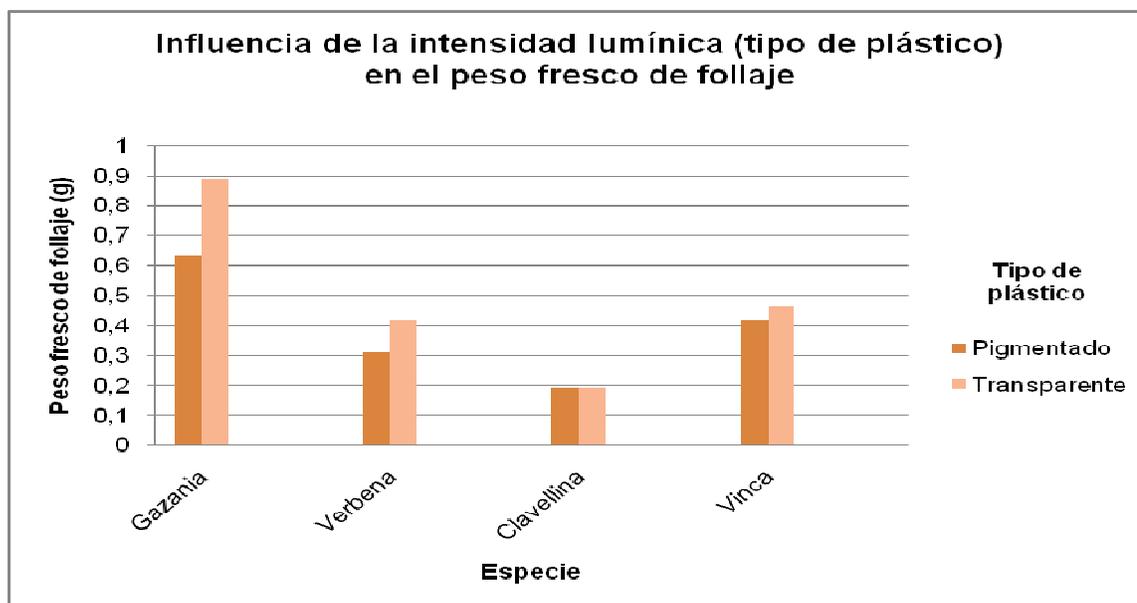


Figura 19. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso fresco de follaje de las 4 especies en estudio.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; con base en los datos del cuadro No.5

De acuerdo a los resultados observados en el gráfico No 19. La Gazania y la Verbena si presenta diferencia significativa en cuanto al uso del plástico transparente, desarrollando mayores pesos frescos de follaje, debido a que este tipo de plástico permite el paso de mayor intensidad lumínica, contrario a la Clavellina y la Vinca que no muestran diferencia significativa en el uso de un plástico u otro.

Cuadro 8. Resultados del peso seco de raíz y de follaje con respecto al tipo de plástico.

Especie	Peso Seco de raíz (g)		Diferencia mínima significativa	P-value
	Pigm.	Trans		
Gazania	0.007933	0.009458	0.0032	Ns
Verbena	0.007175	0.007908	0.0023	Ns
Clavellina	0.00383	0.00317	0.0012	Ns
Vinca	0.007917	0.009667	0.0034	Ns
Especie	Peso Seco de follaje (g)		Diferencia mínima significativa	P- value
	Pigm.	Trans		
Gazania	0.04755	0.05385	0.0115	Ns
Verbena	b 0.03446	a 0.04250	0.0078	**
Clavellina	0.02608	0.02317	0.0058	Ns
Vinca	0.04433	0.04275	0.007	Ns

Ns = Diferencia No significativa

** = Diferencia Significativa.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

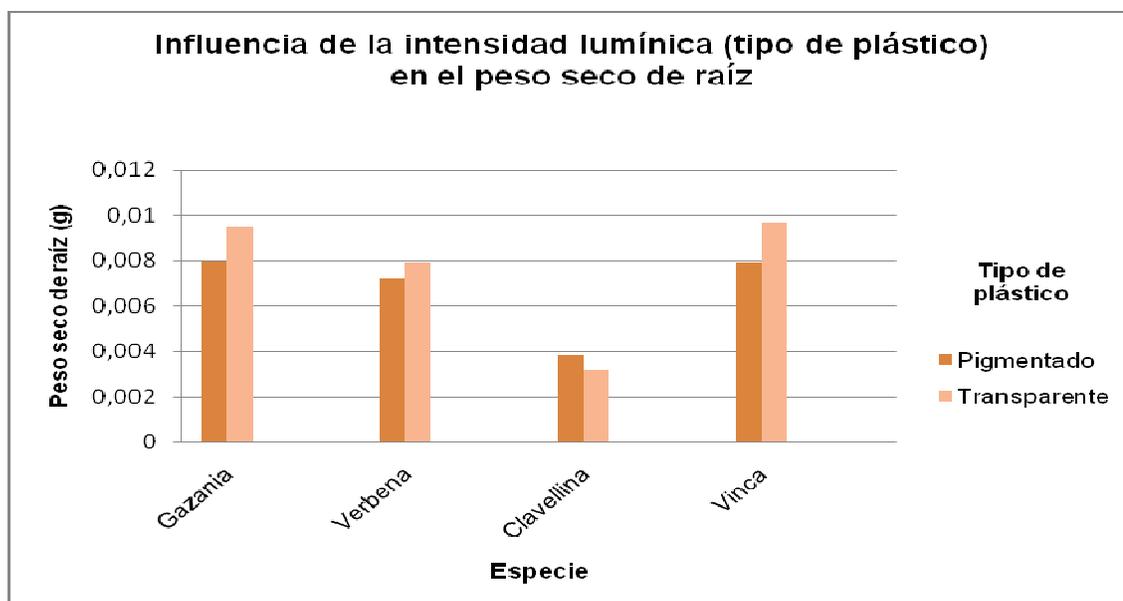


Figura 20. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso seco de raíz de las 4 especies en estudio.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.8

En base en los datos cuadro No.8. En cuanto al peso seco de raíz no se muestra diferencia significativa, de acuerdo a los resultados observados en la gráfica anterior, en la mayoría de las especies en estudio, es más factible el uso de plástico transparente para la correcta aclimatización de la planta.

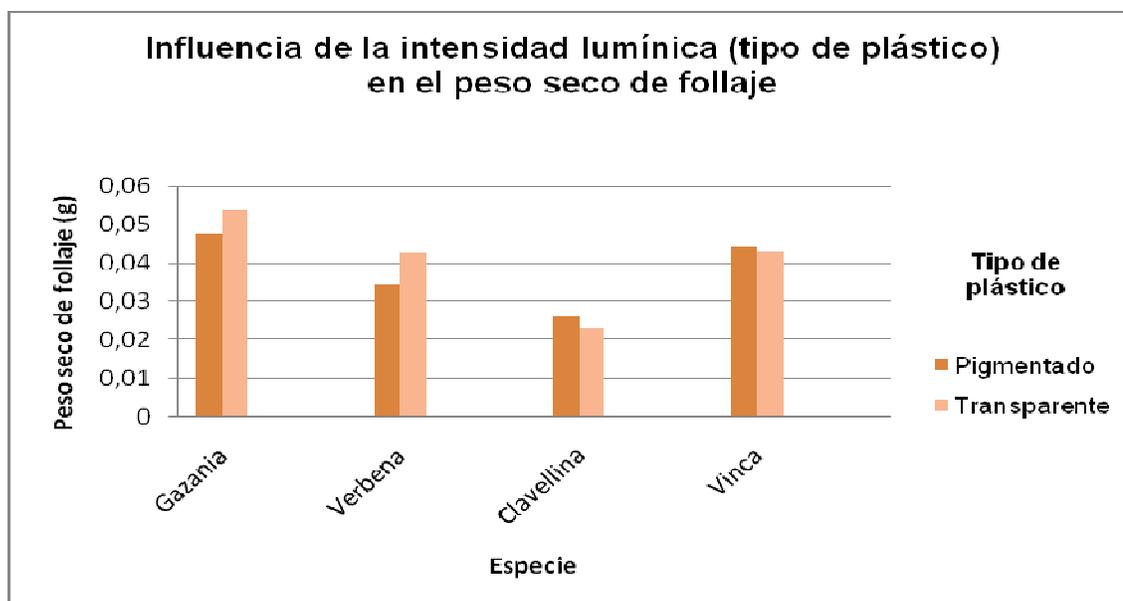


Figura 21. Gráfico de influencia de la intensidad lumínica (tipo de plástico) en el peso seco de follaje de las 4 especies en estudio.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.8

En base en los datos cuadro No.8. Con respecto al peso seco de follaje se muestra diferencia significativa en la Verbena ya que se obtienen un mayor peso seco de follaje utilizando plástico transparente, en cuanto a las otras tres especies en estudio no se muestra diferencia significativa entre el uso de plástico transparente o pigmentado.

2.7.3 Tipo de sustrato

Cuadro 9. Resultados de peso fresco de raíz y follaje, con respecto al tipo de sustrato

Especie	Peso fresco de raíz (g)		Diferencia mínima significativa	P-value	Peso fresco de follaje (g)		Diferencia mínima significativa	P-value
	Mezcla	Arena			Mezcla	Arena		
Gazania	0.08771	0.07867	0.031	Ns	0.8043	0.7169	0.2435	Ns
Verbena	0.09004	0.07293	0.0243	Ns	a 0.4460	b 0.28542	0.092	**
Clavellina	0.0207	0.019	0.0095	Ns	0.18358	0.20267	0.0477	Ns
Vinca	b 0.06825	a 0.10975	0.0407	**	0.42125	0.4600	0.0896	Ns

Cuadro 10. Resultados de la sobrevivencia en la tercer semana con respecto al tipo de sustrato

Especie	Sobrevivencia en semana 3		Diferencia mínima significativa	P-value
	Mezcla	Arena		
Gazania	4	4	0.6842	Ns
Verbena	3	3	0.9008	Ns
Clavellina	4	4	0.9179	Ns
Vinca	4	4	0.77	Ns

Ns = Diferencia No significativa

** = Diferencia significativa

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

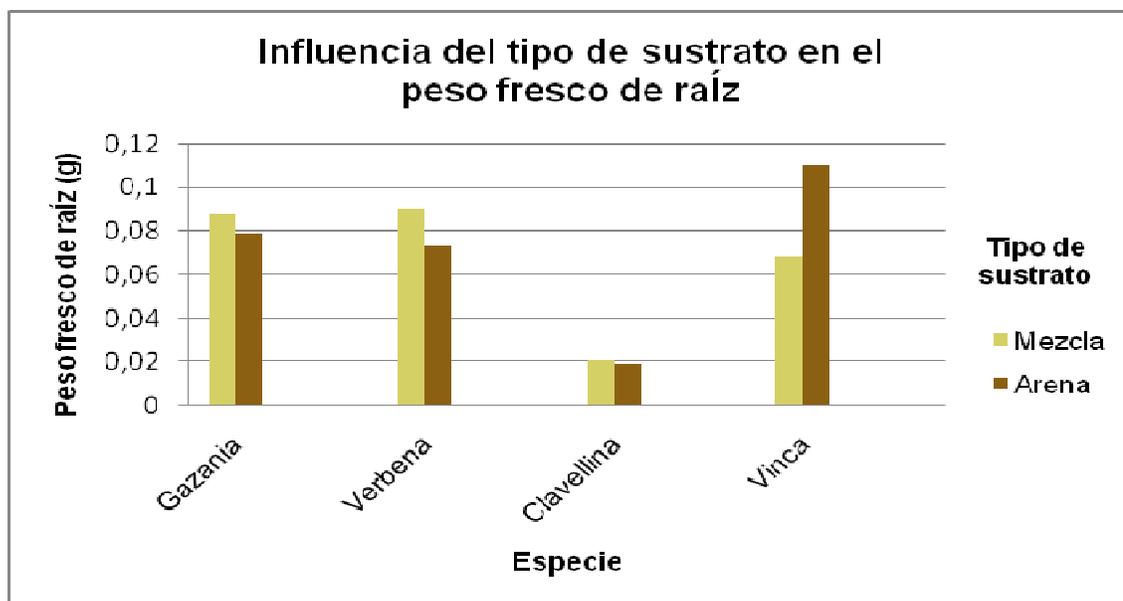


Figura 22. Gráfico de influencia del tipo de sustrato (mezcla o arena) en el peso fresco de raíz de las 4 especies en estudio.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.9

Con base en los resultados del cuadro No.9. En relación al peso fresco de raíz y el tipo de sustrato la Vinca es la única especie que muestra una diferencia significativa, obteniendo mayor peso fresco de raíz al utilizar arena volcánica como sustrato, ya que esta no requiere de alto contenido de humedad en el sustrato en comparación con las demás especies que mostraron mejores resultados en la mezcla.

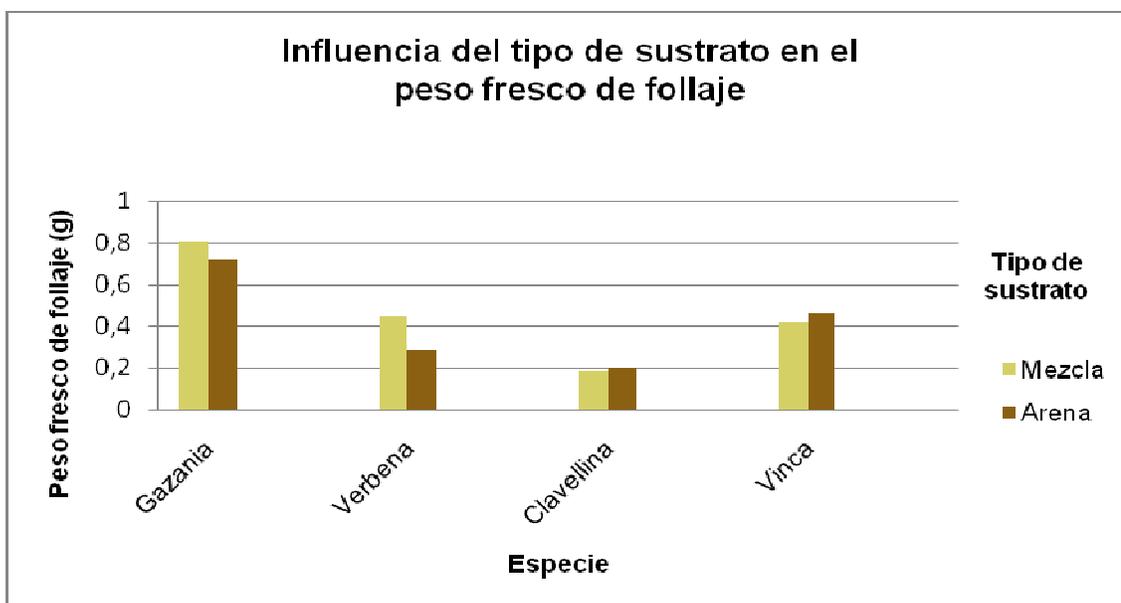


Figura 23. Gráfico de influencia del tipo de sustrato (mezcla o arena) en el peso fresco de follaje de las 4 especies en estudio.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.9

En base a los resultados del cuadro No.9. En cuanto al peso fresco de follaje la Verbena muestra una diferencia significativa en el uso de mezcla como sustrato debido a que dicha especie necesita mayor humedad para el desarrollo de su follaje, las otras tres especies en estudio no muestran una diferencia significativa en cuanto al uso de arena o mezcla como sustrato.

Cuadro 11. Resultados de peso seco y altura en la tercer semana (sustrato)

Especie	Peso Seco de raíz (g)		Diferencia mínima significativa	P-value
	Mezcla	Arena		
Gazania	0.009642	0.00775	0.0032	Ns
Verbena	0.008542	0.006542	0.0023	Ns
Clavellina	0.003667	0.003333	0.0012	Ns
Vinca	b 0.007083	a 0.0105	0.0034	**
Especie	Peso Seco de follaje (g)		Diferencia mínima Significativa	P- value
	Mezcla	Arena		
Gazania	0.052525	0.04883	0.0115	Ns
Verbena	a 0.045342	b 0.03163	0.0078	**
Clavellina	0.025333	0.02391	0.0058	Ns
Vinca	0.042917	0.04416	0.007	Ns

Ns =Diferencia No significativa

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

** = Diferencia Significativa

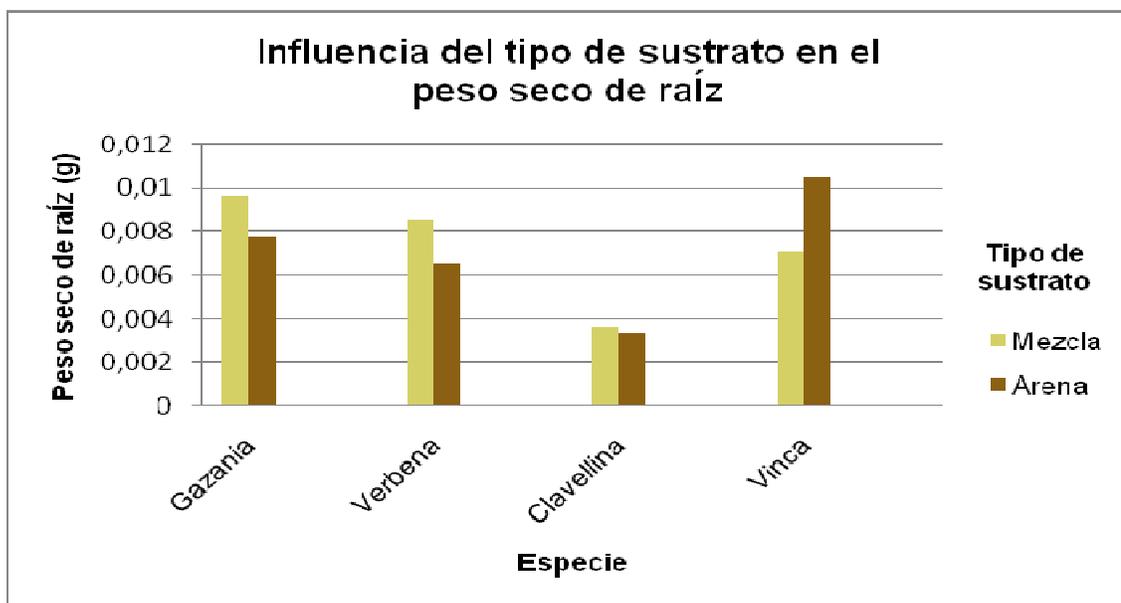


Figura 24. Gráfico de influencia del tipo de sustrato (mezcla o arena) en el peso seco de raíz de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.11

En base a los resultados del cuadro No.11. Con respecto al desarrollo de peso seco de raíz la Vinca muestra una diferencia significativa en cuanto al uso de arena como sustrato debido a que no requiere mayor humedad para el desarrollo de su raíz, a diferencia de las otras tres especies que no muestran diferencia significativa, sin embargo se recomienda el uso de mezcla como sustrato ya que se presentan mayores pesos como se observa en la gráfica anterior.

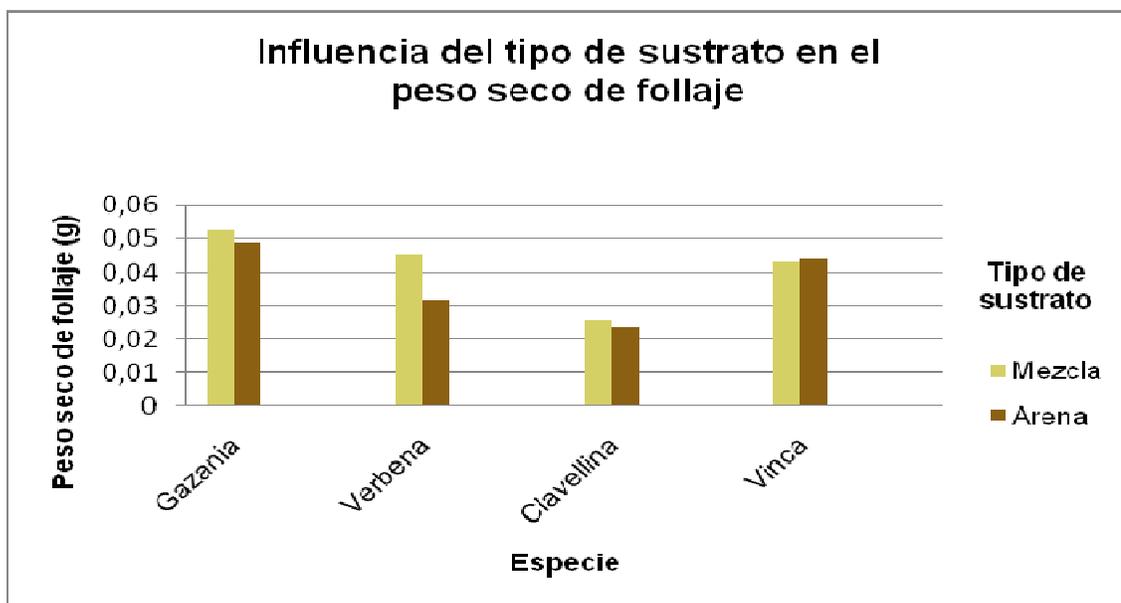


Figura 25. Gráfico de influencia del tipo de sustrato (mezcla o arena) en el peso seco de follaje de las 4 especies en estudio (Gazania, Verbena, Clavellina y Vinca).

Fuente: Cedillo Gámez, PA. en base a los datos del cuadro No.11

En base a los resultados del cuadro No.11. En cuanto al peso seco de follaje la Verbena muestra una diferencia significativa en el uso de mezcla como sustrato, debido a que dicha especie necesita mayor humedad para el desarrollo de su follaje, las otras tres especies en estudio no muestran una diferencia significativa en cuanto al uso de arena o mezcla como sustrato, sin embargo se recomienda el uso de mezcla, ya que ayuda a mantener mayor humedad evitando el riego constante.

2.7.4 Interacción entre altura de túnel, intensidad lumínica y tipo de sustrato.

Interacción de los factores para peso fresco de raíz

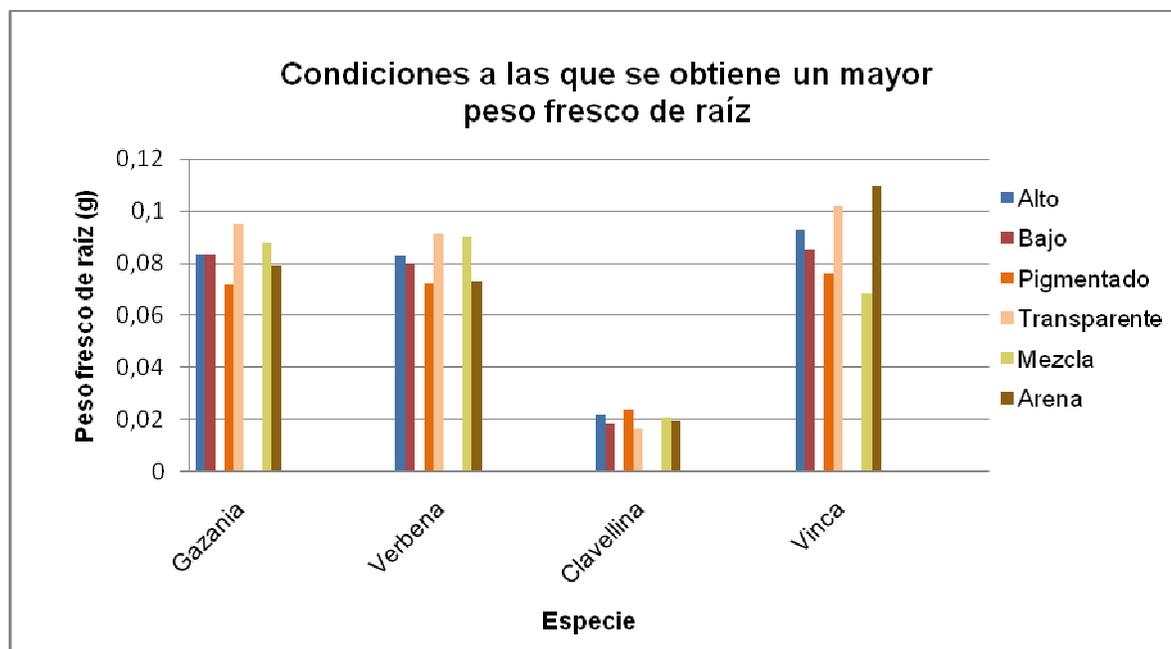


Figura 26. Gráfico de rendimiento de peso fresco de raíz con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a resultados obtenidos.

Gazania: se obtiene un mayor peso fresco de raíz no importando cual sea la altura de túnel, utilizando plástico transparente y mezcla como sustrato.

Verbena: se obtiene mayor desarrollo de peso fresco de raíz utilizando un túnel alto, plástico transparente y mezcla como sustrato.

Clavellina: el mayor peso fresco de raíz se obtiene en túnel alto, utilizando plástico pigmentado y es irrelevante el tipo de sustrato ya sea arena o mezcla.

Vinca: el mayor peso fresco de esta especie se obtiene en condiciones de túnel alto, plástico transparente y utilizando arena como sustrato.

Interacción de los factores para peso fresco de follaje

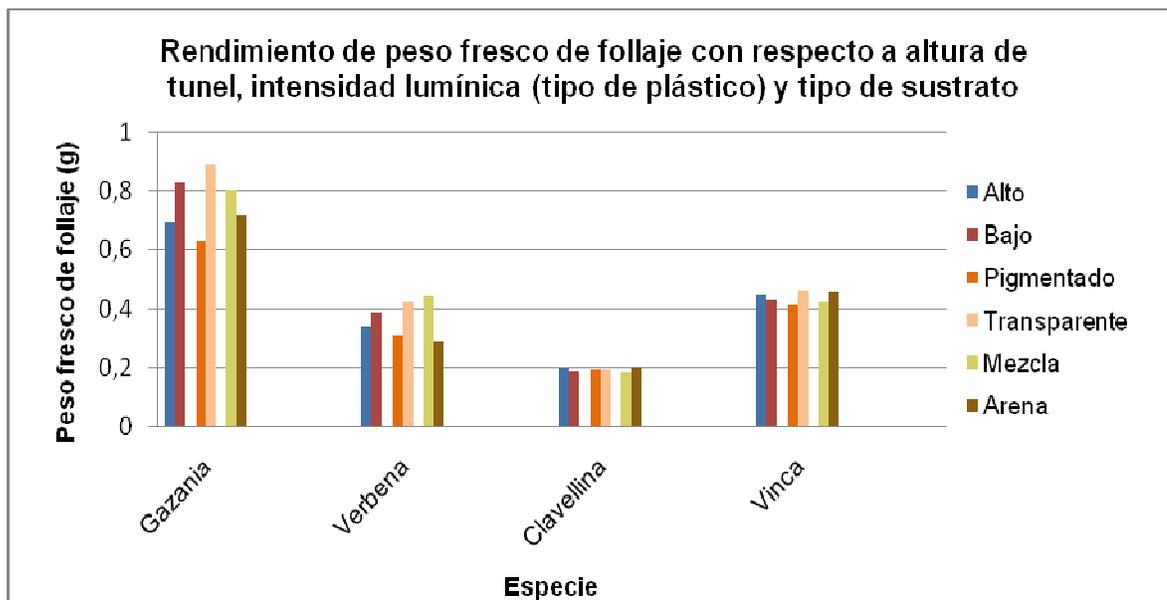


Figura 27. Gráfico de rendimiento de peso fresco de follaje con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a resultados obtenidos.

Gazania: se obtiene un mayor peso fresco de follaje en condiciones de túnel bajo, utilizando plástico transparente y mezcla como sustrato.

Verbena: se obtiene mayor peso fresco de follaje utilizando un túnel bajo, plástico transparente y mezcla como sustrato.

Clavellina: no se muestran diferencias significativas en cuanto a las condiciones para obtener un mayor peso fresco de follaje.

Vinca: las condiciones no muestran una diferencia significativa, sin embargo las condiciones recomendadas son con túnel alto, plástico transparente y arena como sustrato.

Interacción de los factores para peso seco de raíz

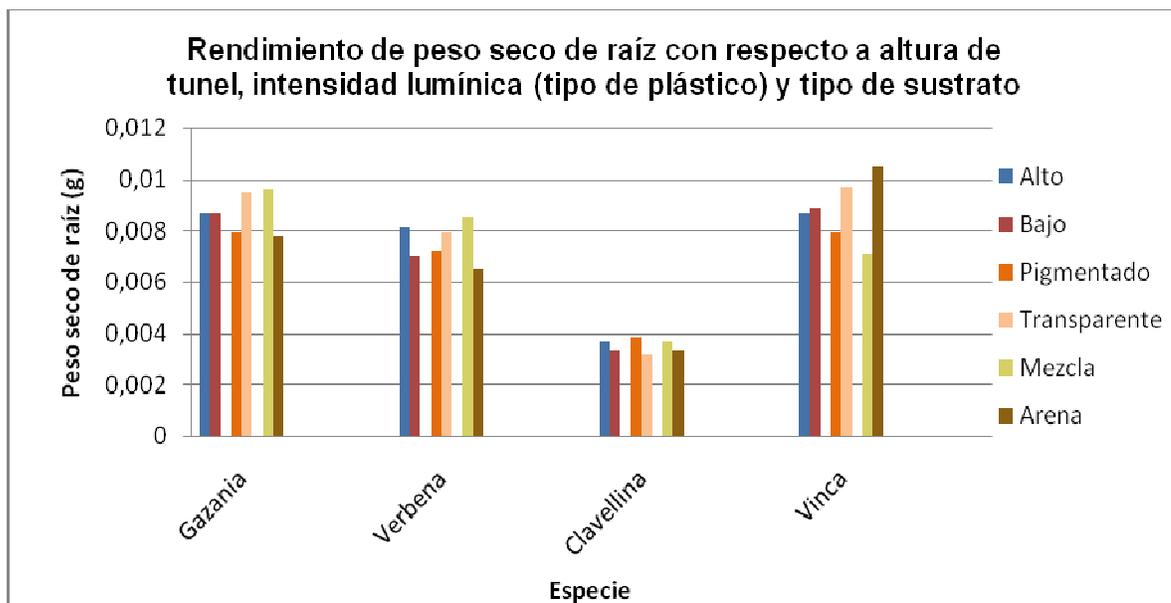


Figura 28. Gráfico de rendimiento de peso seco de raíz con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a resultados obtenidos.

Gazania: con respecto al peso seco de raíz no se presenta diferencia en cuanto a la altura de túnel, se obtiene un mayor peso utilizando plástico transparente y mezcla como sustrato.

Verbena: se obtiene un mayor peso seco de raíz utilizando túnel alto, con plástico transparente y mezcla como sustrato.

Clavellina: se obtiene mayor peso seco de raíz en túnel alto, con plástico pigmentado y mezcla como sustrato.

Vinca: se obtiene mayor peso fresco de follaje en condiciones de túnel bajo, plástico transparente y arena como sustrato.

Interacción de los factores para peso seco de follaje

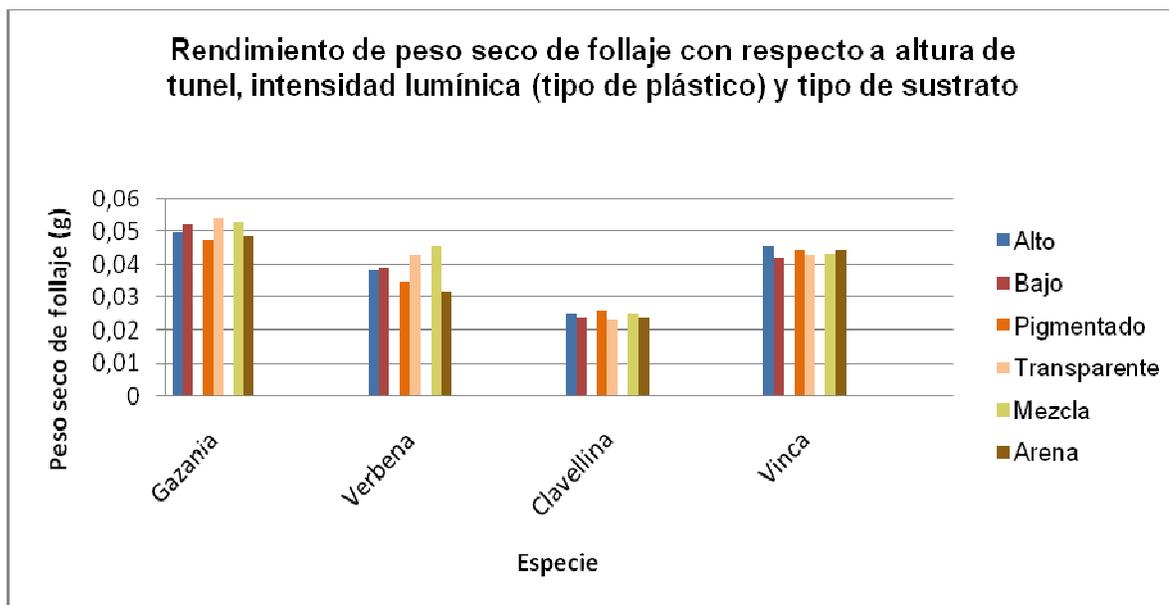


Figura 29. Gráfico de rendimiento de peso seco de follaje con respecto a altura de túnel, intensidad lumínica (tipo de plástico) y tipo de sustrato

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a resultados obtenidos.

Gazania: se consideran que las mejores condiciones para obtener mayor peso fresco de follaje es utilizando un túnel bajo, con plástico transparente y mezcla como sustrato.

Verbena: de acuerdo a los resultados se considera que se obtiene un mayor peso seco de follaje en túnel bajo, con plástico transparente y utilizando mezcla como sustrato.

Clavellina: se considera que obtiene mayor peso seco de follaje en túnel alto, con plástico pigmentado y mezcla como sustrato.

Vinca: en esta especie las condiciones a las que se obtuvo mayor peso seco son en túnel alto, plástico pigmentado y arena como sustrato.

2.7.5 Mejor tratamiento y porcentaje de sobrevivencia por especie a la tercera semana.

Sobrevivencia de Gazania

Cuadro 12. Sobrevivencia de Gazania a la tercera semana en relación a cada tratamiento

No. tratamiento	Promedio de plantas por bandeja después de 3 semanas	Total de plantas en las bandejas después de 3 semanas	Porcentaje de supervivencia (%)
Tratamiento 1	4	11	73.33
Tratamiento 2	3	10	66.67
Tratamiento 3	4	12	80.00
Tratamiento 4	4	13	86.67
Tratamiento 5	4	12	80.00
Tratamiento 6	4	13	86.67
Tratamiento 7	4	13	86.67
Tratamiento 8	5	15	100.00

Por tratamiento se sembraron 3 bandejas con 5 plantas cada una para un total de 15 plantas.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.



Figura 30. Gráfico de sobrevivencia de Gazania después de tres semanas.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.12

Mejor tratamiento para Gazania

Para Gazania el tratamiento 8 presentó un 100% de sobrevivencia a la tercera semana, siendo este tratamiento el más eficiente; el tratamiento consistía en plástico transparente, túnel de arco bajo, sustrato 90% arena volcánica de 1/8' +10% de turba rubia sin fertilización.

Ubicación: Bandeja 24 (Tratamiento 8)

Características: Hojas suculentas, sin manchas, de buen color, estas plantas se ubicaron justamente bajo los factores más favorables para la climatización de Gazania, estas recibieron el mismo cuidado que todas las plantas del experimento.



Figura 31. Plantas de Gazania mejor adaptadas a las 3 semanas

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

Sobrevivencia Verbena

Cuadro 13. Sobrevivencia de Verbena a la tercera semana en relación a cada tratamiento

No. tratamiento	Promedio de plantas por bandeja después de 3 semanas	Total de plantas en las bandejas después de 3 semanas	Porcentaje de supervivencia (%)
Tratamiento 1	4	12	80.00
Tratamiento 2	4	12	80.00
Tratamiento 3	4	12	80.00
Tratamiento 4	4	12	80.00
Tratamiento 5	2	7	46.67
Tratamiento 6	4	11	73.33
Tratamiento 7	4	11	73.33
Tratamiento 8	3	9	60.00

Por tratamiento se sembraron 3 bandejas con 5 plantas cada una para un total de 15 plantas.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

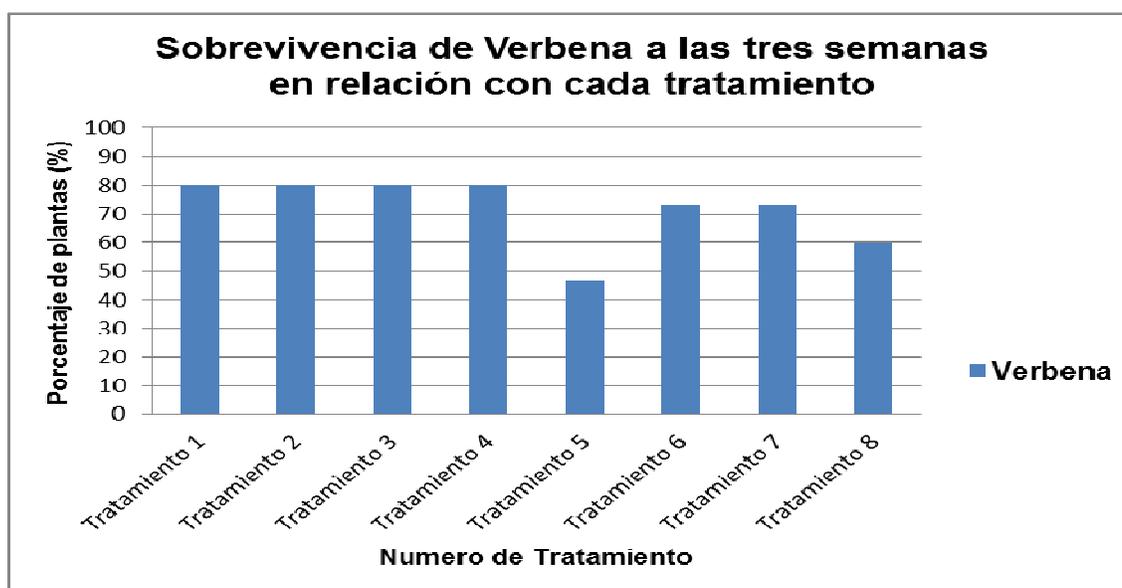


Figura 32. Gráfico de supervivencia de Verbena después de tres semanas según los diferentes tratamientos aplicados.

Fuente: Cedillo Gámez, PA. en base a los datos del cuadro No.13

Mejor tratamiento para Verbena

Los tratamiento más eficientes fueron el 1, 2, 3, y 4 los cuales presentaron un 80% de sobrevivencia a la tercera semana, en los cuatro tratamientos se utilizó plástico pigmentado, siendo las variables la altura de túnel y el tipo de sustrato, lo cual indica que si existe influencia del plástico pigmentado en la sobrevivencia de las plantas de Verbena.

Ubicación: Bandeja 13 (Tratamiento 4)



Figura 33. Plantas de verbena mejor adaptadas a las 3 semanas

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

Sobrevivencia de Clavellina

Cuadro 14. Sobrevivencia de Clavellina a la tercera semana en relación a cada tratamiento

No. tratamiento	Promedio de plantas por bandeja después de 3 semanas	Total de plantas en las bandejas después de 3 semanas	Porcentaje de supervivencia (%)
Tratamiento 1	3	10	66.67
Tratamiento 2	4	11	73.33
Tratamiento 3	5	14	93.33
Tratamiento 4	3	10	66.67
Tratamiento 5	5	15	100.00
Tratamiento 6	5	15	100.00
Tratamiento 7	4	13	86.67
Tratamiento 8	3	10	66.67

Por tratamiento se sembraron 3 bandejas con 5 plantas cada una para un total de 15 plantas.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

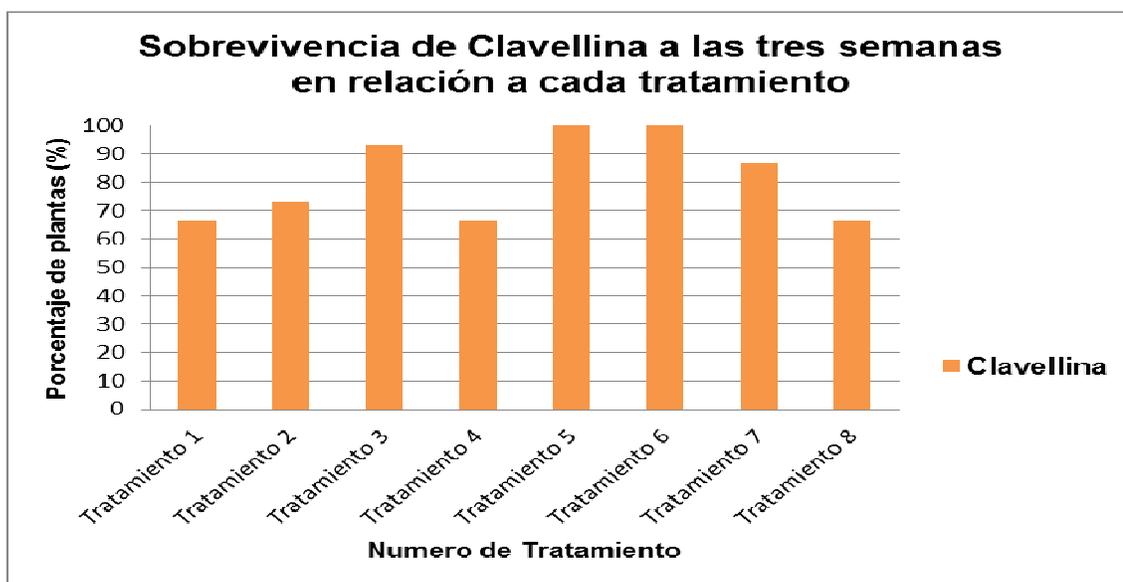


Figura 34. Gráfico de supervivencia de Clavellina después de tres semanas según los diferentes tratamientos aplicados.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; en base a los datos del cuadro No.14

Mejor tratamiento para Clavellina

Para las plantas de Clavellina los mejores tratamientos fueron el 5 y el 6 en los cuales se obtuvo un 100% de sobrevivencia, en estos dos tratamientos el factor común son el tipo de túnel alto y el tipo de plástico transparente variando únicamente el tipo de sustrato, por lo que los factores que conservan la sobrevivencia de la especie son el túnel alto y el plástico transparente.

Ubicación: Bandeja 13 (Tratamiento 5)



Figura 35. Plantas de Clavellina mejor adaptadas a las 3 semanas.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

Sobrevivencia de Vinca

Cuadro 15. Sobrevivencia de Vinca a la tercera semana en relación a cada tratamiento

No. tratamiento	Promedio de plantas por bandeja después de 3 semanas	Total de plantas en las bandejas después de 3 semanas	Porcentaje de supervivencia (%)
Tratamiento 1	3	9	60.00
Tratamiento 2	4	12	80.00
Tratamiento 3	5	15	100.00
Tratamiento 4	5	14	93.33
Tratamiento 5	5	15	100.00
Tratamiento 6	5	14	93.33
Tratamiento 7	3	10	66.67
Tratamiento 8	5	14	93.33

Por tratamiento se sembraron 3 bandejas con 5 plantas cada una para un total de 15 plantas.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

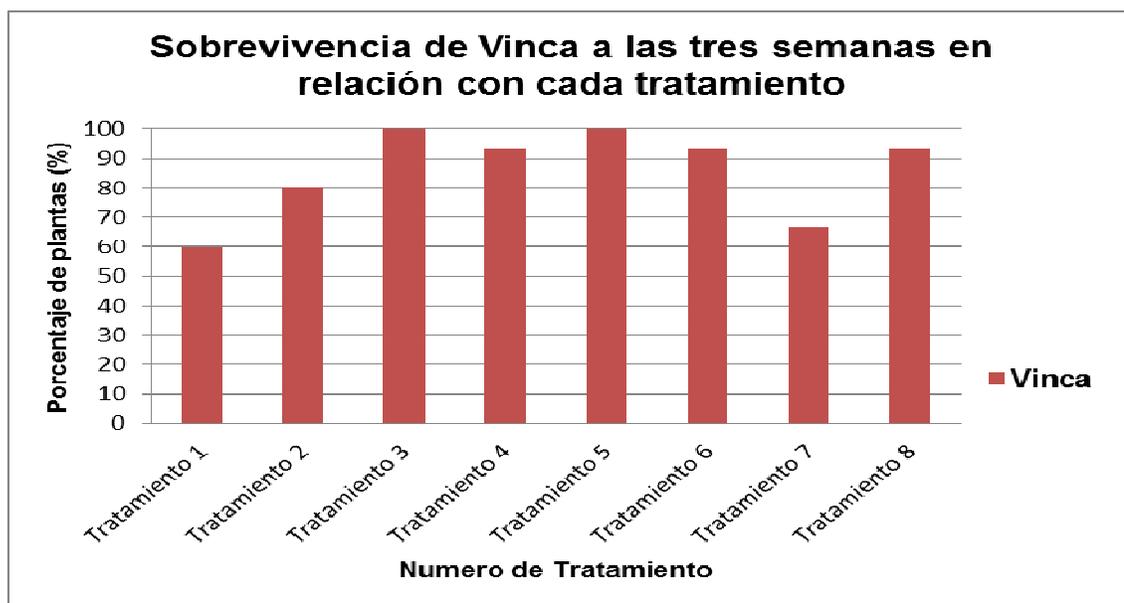


Figura 36. Gráfico de supervivencia de Vinca después de tres semanas según los diferentes tratamientos aplicados.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.; con base en los datos del cuadro No.15

Mejor tratamiento para Vinca

Los mejores tratamientos para Vinca fueron el 3 y 5 en los que se obtuvo un 100% de sobrevivencia, en los dos tratamientos se utilizó arena como sustrato, siendo las variables la altura de túnel y el tipo de plástico, por lo que la arena como sustrato es un factor determinante para la correcta aclimatización de la Vinca.

Ubicación: Bandeja 18 (Tratamiento 5)



Figura 37. Plantas de Vinca mejor adaptadas a las 3 semanas.

Fuente: Fotografías Cedillo Gámez, P.A. 2008

2.8 Conclusiones

1. El protocolo para Aclimatización de *in vitro* a *ex vitro* de plantas de *Gazania* (*Gazania* sp), *Verbena* (*Verbena hybrida*), *Clavellina* (*Dianthus deltoides*), y *Vinca* (*Catharanthus roseus*) de la Empresa “Jardines Mil Flores S.A.” es el siguiente:

En el Laboratorio

- Incrementar la intensidad lumínica de las plantas a 800 fc (idealmente)
- Quitar el sello de plástico 2 días antes de lavar la planta, para que tengan contacto con el aire, un día antes se puede quitar completamente el tapón.
- Lavar las plantas cuidadosamente asegurándose de quitar completamente el medio de cultivo para evitar contaminación por hongos o bacterias.
- Colocarlas en papel mayordomo húmedo dentro de bolsas plásticas transparentes agujereadas e identificadas o en bandejas plásticas con su debida etiqueta de identificación.

En el Invernadero

- El sustrato que se utilice deberá ser previamente esterilizado, para evitar contaminación.
- Antes de la siembra de las plantas provenientes de laboratorio deberán ser inmersas en fungicida y bactericida.
- Las especies antes mencionadas deberán sembrarse en bandejas de 144 celdas nuevas o esterilizadas, para evitar la contaminación.
- Las plantas deben llegar al invernadero con raíz, de no ser así se debe utilizar una hormona de enraizamiento.
- Se sellarán las plantas sembradas con neblina suave al pie de la planta.
- Ya sembradas las plantas si se observa que se doblan con la primera neblina, y las hojas tocan el sustrato se deberá realizar una poda, las tijeras que se utilicen deberán limpiarse con Etanol 1cc/litro, esto evitara la transmisión de enfermedades de planta a planta.

1. Para la especie *Gazania* (*Gazania* sp.) se presentan mayores pesos frescos y secos de raíz y de follaje, al mismo tiempo que un 100% de supervivencia utilizando túnel del arco bajo, plástico transparente y mezcla como sustrato, por lo que estas condiciones de aclimatización son las de mayor beneficio para la planta.
2. En cuanto a la especie *Verbena* (*Verbena hybrida*), para la obtención de mayores pesos frescos y secos de raíz y de follaje, la utilización de plástico transparente, mezcla como sustrato y no representando diferencia significativa el uso de túnel bajo o alto, son las condiciones de aclimatización correctas; y en cuanto a la supervivencia de la especie el uso de plástico pigmentado representa la condición necesaria de sobrevivencia, siendo variables las demás condiciones.
3. Para la especie *Clavellina* (*Dianthus deltoides*) las condiciones correctas de aclimatización a las que se obtiene mayores pesos frescos y secos de raíz y de follaje, son utilizando túnel de arco alto, plástico pigmentado y mezcla como sustrato; en cuanto a la sobrevivencia de la especie el uso de túnel de arco alto y el plástico transparente son las condiciones determinantes siendo variable el tipo de sustrato a utilizar.
4. La especie *Vinca* (*Catharanthus roseus*) presenta mayores pesos frescos y secos de raíz y de follaje a condiciones de aclimatización utilizando plástico transparente, arena como sustrato, no presentando diferencia significativa en cuanto al uso de túnel alto o bajo; y en cuanto a la sobrevivencia se presenta un 100% de supervivencia teniendo como condición determinante el uso de arena como sustrato, siendo variable la altura de túnel y el tipo de plástico.

2.9 Recomendaciones

1. En las condiciones de aclimatización en las que el uso de túnel alto o bajo; se recomienda el uso del túnel de arco bajo debido a que requiere menos material para su construcción lo cual es más rentable.
2. El manejo del túnel queda a discreción del regador, es correcto que en los días de mucho calor se levante uno de los lados del túnel para permitir mayor corriente de viento.
3. Mantener un rango apropiado de temperatura para aclimatización de 15-25 °C y una humedad relativa del 85% dentro de los túneles.
4. Para mejorar la sobrevivencia de las plantas en el invernadero se recomienda que se tomen en cuenta los resultados de esta investigación, aunque se considera apropiado repetir el experimento en otras épocas del año, debido a que es el primer experimento documentado que se realiza dentro de la empresa y necesita un comparador.

2.10 Bibliografía

1. Abad, M. 1991. Los sustratos hortícolas y las técnicas de cultivo sin suelo. *In* Rallo, L; Nuez, F (eds). La horticultura española en la C.E. Tarragona, España, Ediciones de Horticultura. p. 270-280.
2. _____. 1993. Sustratos para el cultivo sin suelo: inventario y características. *In* Cánovas, F; Díaz, JR (eds). Curso superior de especialización sobre cultivos sin suelo. Almería, España, IEA / FIAPA. p. 63-80.
3. _____. 1995. Sustratos para el cultivo sin suelo. *In* Nuez, F (coord.). El cultivo del tomate. Madrid, España, Mundi-Prensa. p. 131-166.
4. Abad, M; Noguera, P. 1998. Sustratos para el cultivo sin suelo y fertirrigación. *In* Cadahía (Coord.). Fertirrigación: cultivos hortícolas y ornamentales. Madrid, España, Mundi-Prensa. p. 287-342.
5. Agramonte, D; Jiménez, F; Dita, M. 1998. Acclimatización: propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez Ponce, JN (ed). Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas. p. 193-206.
6. Agramonte, D; Pérez, J; Pérez, M; Pérez, A. 1993. Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCL) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Ciudad Habana, Cuba, Centro Agrícola. p. 88-89.
7. Alpi, A; Tognoni, F. 1999. Cultivo en invernadero. Madrid, España, Mundi-Prensa. 347 p.
8. Barrios, O. 2005. Construcción de un invernadero FUCOA (en línea). Chile, Gobierno de Chile, Región Metropolitana. Consultado 30 jun 2011. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/aup/pdf/construinv.pdf>
9. Blanc, D. 1987. Les cultures hors sol. 2 ed. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 409 p.
10. Brainerd, K; Fuchigami, L. 1981. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO₂. *J. Exp. Bot.* 33:388-392.

11. Chacón, G; Saborio, F; Gómez, L; Torres, S. 2005. Aclimatización de plántulas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas *in vitro* (en línea). Agronomía Costarricense 29(3):47-58. Consultado 28 ago 2008 .
Disponible en www.mag.go.cr/revagr/inicio.htm
12. Deberg, P. 1991. Acclimatization techniques of plant from *in vitro* plant biotechnology. Acta Hort. 289:271-299.
13. Díaz-Pérez, J; Shackel, K; Sutter, E. 1995. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. Journal of American Society of Horticultural Science 120(3):435-440.
14. Donnelly, D; Vidaver, W; Lee, K. 1985. The anatomy of tissue culture red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell Tissue and Organ Culture 4:43-50.
15. Elias C, F; Castellvi S, F. 2001. Agrometeorología. 2 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 517 p.
16. FAO, IT. 1990. Soilless culture for horticultural crop production. Roma, Italia, FAO. 188 p. (Plant Production and Protection Paper no. 101).
17. Ferrato, J; Panelo, M. 2003. Climatización de invernaderos: consejo de investigaciones (en línea). Revista IDIA 21(4):. Consultado 10 feb 2011. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/horticola/etc01.pdf>
18. Grout, B. 1975. Wax development on leaf surfaces on *Brassica oleracea* var Currawong regenerated from meristem cultures. Plant Sci. Lett. 5:401-405.
19. Hoyos, V; Palma, N. 1995. Diccionario de floricultura. Illinois, Estados Unidos, Ball Publishing. 414 p.
20. Huylenbroeck, J; Debergh, P. 1996. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2(3):136-141.
21. Infojardin.com. 2000a. *Dianthus deltoides* clavellina (en línea). España. Consultado 30 jul 2009. Disponible en: <http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/dianthus-deltoides-clavellina-clavelina.htm>
22. _____. 2000b. *Gazania* (en línea). España. Consultado 30 jul 2009. Disponible en: <http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/gazania-hybrida-gazania-splendens.htm>
23. _____. 2000c. *Verbena hybrida* (en línea). España. Consultado 30 jul 2009. Disponible en: <http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/verbena-hybrida-verbena.htm>

24. _____. 2000d. Vinca (en línea). España. Consultado 30 jul 2009. Disponible en <http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/vinca-rosea-catharanthus-roseus-vincapervinca.html>
25. Martínez P. F. 2001. Materiales plásticos para cubierta de invernadero: Curso de formación de formadores en horticultura protegida y semiprotegida. Santa Cruz de la Sierra Bolivia, Agencia Española de Cooperación Internacional. 15 p
26. Michelot, P. 1999. Relations substrat - irrigation. In Michelot, P; Chambolle, C (coord). L'irrigation en pépinière hors sol. Paris, Astredor. p 19-27.
27. Mogollón, N. 1995. Comportamiento hortícola de tres cultivares de *Gerbera jamesonii* Bolux Ex Hoox y su propagación *in vitro*. Trabajo de ascenso a optar categoría de Asociado en el escalafón del Personal Docente y de Investigación. Barquisimeto, Lara, Venezuela, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. p. 92-94.
28. _____. 2002. Multiplicación, aclimatización y cambios morfo-anatómicos de plantas *in vitro* de *Dieffenbachia maculata* Schott. Trabajo presentado a optar categoría de Titular en el escalafón del Personal Docente y de Investigación. Barquisimeto, Lara, Venezuela, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. p. 23-28.
29. Nieto, L. 2008. Aclimatización y desarrollo en vivero de *Dendrobium* Lorrie Mortimer cultivado en seis sustratos. Tesis Ing Agr. Venezuela, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. 53 p.
30. Pacheco, A. 2010. Factores ambientales y su influencia en invernaderos, ACEA (en línea). México. Asesores en Construcción y Extensión Agrícola. Consultado 4 jul 2011. Disponible en: <http://www.acea.com.mx/inicio/pagina-26-2>
31. Paques, H. 1991. Acclimatization techniques. Plant Biotechnology Acta Hort. 288:291-300.
32. Peñalver, D; Jiménez, F; Dita, M. 1998. Aclimatización. In Pérez, J (ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas / Ediciones GEO. p. 193-205.
33. Pierik, R. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff. 344 p.
34. Poole, R; Conover, C. 1983. Establishment and growth of *in vitro* cultured *Dieffenbachia*. HortScience 18(2):185-187.

35. Preece, J; Sutter, E. 1990. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In* Debergh, P; Zimmerman, R (eds). Micropropagation technology and application. Dordrecht, Netherlands, Kluwer. p. 71-94.
36. Preece, JE; Sutter, GE. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field: micropropagations technology and application. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 571 p.
37. Raviv, M; Chen, Y; Inbar, Y. 1986. Peat and peat substitutes as growth media for container grown plant. *In* Chen, Y; Avnimelech, Y (eds). The role of organic matter in modern agriculture. Dordrecht, The Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers. p. 257-287.
38. Riquelme, C; Guiñazú, E; Tizio, R. 1991. Preacondicionamiento y aclimatación, en condiciones de invernáculo, de plántulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *_YTON* 52(1):73-82.
39. Seon, J; Cui, Y; Kozai, T; Paek, K. 2000. Influence of *in vitro* growth glutinosa plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61:135-142.
40. Serrano C, Z. 2002. Construcción de invernaderos. Madrid, España, Mundi-Prensa. 499 p.
41. Sutter, E; Langhans, R. 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60:2896-2902.
42. Terés, V. 2001. Relaciones aire agua en sustratos de cultivo como base para el control del riego: metodología de laboratorio y modelización. Tesis PhD. Madrid, España, UPM, ETSI Agrónomos. 525 p.
43. Trujillo, I; García, E de; Berroteran, J. 1999. Evaluación de plantas de banano obtenidas *in vitro*. *Anales de Botánica Agrícola* 6:29-35.
44. Wetzstein, H; Richardson, E; He, Y. 2002. Alterations in anatomy and ultrastructure of pecan leaves treated with propiconazole during shoot expansion. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 127(1):8-12.
45. Ziv, M. 1995. *In vitro* aclimatización. *In* Aitken Cristie, J; Kosai, T; Lila Smith, M (eds). Automatización and environ mental control in plant tissue culture. Netherlands, Klumer Publisher. p. 493-516.

ANEXOS

ANEXO 1. Croquis del experimento, bandejas aleatorizadas.

ANEXO 2. Condiciones ambientales dentro del invernadero.

Anexo 1. Croquis del experimento, bandejas aleatorizadas

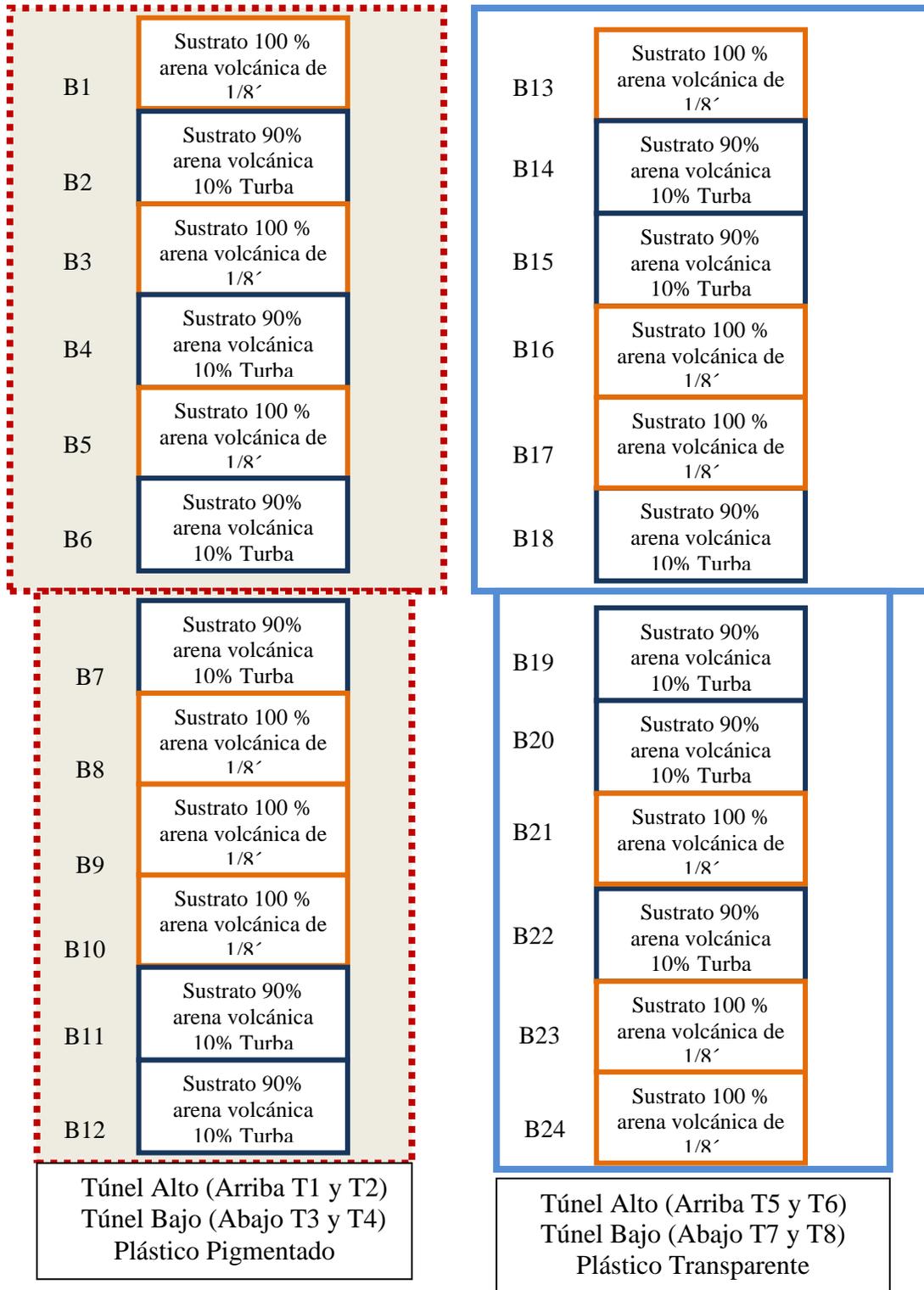


Figura 38A. Ubicación de los tratamientos.

Fuente: Elaborado por Cedillo Gámez, PA. 2008

Anexo 2. Condiciones ambientales dentro del invernadero.

a. Condiciones ambientales dentro del invernadero para Gazania y Verbena.

Cuadro 16A. Túnel alto pigmentado, plantas de Gazania y Verbena del 22 de abril al 5 de mayo

Lectura	Máxima	Fecha y hora	Mínima	Fecha y hora
Temperatura	33.17°C	25/4 a la 13:00 p.m	14.85°C	25/4 a las 6:00 a.m.
Humedad relativa	99 %	1/5 a las 8:00 am	27%	27/4 a las 12:00 a.m.
Intensidad lumínica	685(lum/sqf)	2/5 a la 13:00 p.m	1(lum/sqf)	Varios días

Cuadro 17A. Túnel bajo pigmentado, plantas de Gazania y Verbena del 22 de abril al 5 de mayo

Lectura	Máxima	Fecha y hora	Mínima	Fecha y hora
Temperatura	30.71°C	29/4 a la 13:00	15.23°C	25/4 a las 6:00 a.m
Humedad relativa	104 %	Varios días	42.4 %	29/4 a las 15:00
Intensidad lumínica	413 pies –candela			

Cuadro 18A. Túnel alto transparente plantas de Gazania y Verbena, del 22 de abril al 5 de mayo

Lectura	Máxima	Fecha y hora	Mínima	Fecha y hora
Temperatura	36.76	23/4 a la 13:00 p.m.	14.85°C	25/4 a las 6:00
Humedad relativa	103.6 %	Varios días	26 %	27/4 a las 12:00
Intensidad lumínica	590 pies- candela			

Cuadro 19A. Túnel bajo transparente plantas de Gazania y Verbena, del 22 de abril al 5 de mayo

Lectura	Máxima	Fecha y hora	Mínima	Fecha y hora
Temperatura	31.12°C	23/4 a la 13:00 p.m.	15.23 °C	25/4 a las 6:00
Humedad relativa	103.6 %	Varios días	50.3%	23/4 a las 13:00
Intensidad lumínica	516 pies- candela			

b. Condiciones ambientales dentro del invernadero para Clavellina y Vinca.

**** No hay datos del túnel Alto pigmentado por mal funcionamiento de los instrumentos de medición.**

Intensidad lumínica: 471 pies – candela

Cuadro 20A. Túnel bajo pigmentado para Clavellina y Vinca, del 6 de mayo al 21 de mayo

Lectura	Máxima	Fecha y hora	Mínima	Fecha y hora
Temperatura	34.01	11/5 a las 13:00	16.38°C	8/5 a las 6:00 a.m.
Humedad relativa	104%	Varios días	37.3%	8/5 a las 6:00 a.m.
Intensidad lumínica	428 pies-candela			

Cuadro 21A. Túnel alto transparente para Clavellina y Vinca, del 6 de mayo al 21 de mayo

Lectura	Máxima	Fecha y hora	Mínima	Fecha y hora
Temperatura	35.7 °C	11/5 a las 13:00	16°C	8/5 a las 6:00 a.m.
Humedad relativa	103.6 %	Varios días	39%	7/5 a las 11:00 a.m.
Intensidad lumínica	597 pies- candela			

Cuadro 22A. Túnel bajo transparente para Clavellina y Vinca, del 6 de mayo al 21 de mayo

Lectura	Máxima	Fecha y hora	Mínima	Fecha y hora
Temperatura	33.17°C	11/5 a las 13:00	16.76°C	Varios días
Humedad relativa	103.6%	Varios días	44.6 %	11/5 a las 13:00
Intensidad lumínica	512 pies- candela			

CAPÍTULO III

SERVICIOS REALIZADOS EN LOS LABORATORIOS DE CULTIVO DE TEJIDOS Y FITOPATOLOGÍA DE LA EMPRESA JARDINES MIL FLORES S.A.

3.1 Presentación

El Ejercicio Profesional Supervisado, es uno de los requisitos de graduación contenidos en el reglamento de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el objetivo es que el estudiante, además de poner en práctica los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, tenga una interrelación con la entidad donde sea ubicado y se forme una idea concreta de la vida laboral de nuestro país en el área agrícola.

La empresa Jardines Mil Flores S.A. es una empresa líder en la exportación de semillas de ornamentales, es una empresa con ideas innovadoras, que se esfuerza por complacer la exigencias constantemente cambiantes de sus clientes alrededor del mundo. El presente informe de servicios se desprende del diagnóstico realizado al inicio del EPS, en los laboratorios de Cultivo de Tejidos y Fitopatología de la empresa “Jardines Mil Flores S.A.”. En base al diagnóstico realizado se pudieron determinar los principales problemas que se prestaban en los laboratorios de la empresa “Jardines Mil Flores S.A.”, en base a estos problemas se determinaron los servicios a realizar dentro de los laboratorios, con el propósito de contribuir a la solución de los mismos.

3.2 Protocolo de iniciación para trece especies de ornamentales, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la empresa “Jardines Mil Flores S.A”.

3.2.1 Objetivos

General

Elaborar un protocolo de iniciación para trece especies ornamentales, evaluando tiempos de desinfección.

Específico.

- Determinar cuál de los tratamientos es más efectivo para la desinfección de los explantes provenientes de bloque madre.
- Identificar qué tratamiento ocasiona menos daño a los explantes.

3.2.2 Metodología

a. Selección de explantes

Los explantes de las especies que fueron seleccionadas para el proceso de iniciación fueron solicitados con diez días de anticipación por varias razones, una de ellas es la distancia a la que se encuentran las fincas en donde están establecidos los bloques madre, pero la principal es que las plantas madre reciben un tratamiento previo con fungicidas, tratamiento vital para el éxito del proceso, los productos y dosis son las que se indican en los protocolos establecidos por la empresa para cada cultivo. **Ver Cuadro 23.**

Cuadro 23. Identificación de la especie, fechas de aplicaciones, envío y prueba.

Especie	# de esquejes	Finca	Aplicación preventiva	Fecha de envío	Fecha de iniciación.
China	40	Jalapa	28/04/08 al 07/05/08	08/05/08	09/05/08
Dahlia	40	Jalapa	28/04/08 al 07/05/08	08/05/08	09/05/08
Verbena	40	JMF	07/04/08 al 14/05/08	15/05/08	16/05/08
Gazania	40	JMF	07/04/08 al 14/05/08	15/05/08	16/05/08
Rudbeckia	40	JMF	07/04/08 al 14/05/08	15/05/08	16/05/08
Pentas	40	JMF	07/04/08 al 14/05/08	15/05/08	16/05/08
Pensamiento	40	Las Vertientes	07/04/08 al 14/05/08	15/05/08	16/05/08
Begonia	40	Las Vertientes	07/04/08 al 14/05/08	15/05/08	16/05/08
Penstemon	40	JMF	21/06/08 al 28/05/08	01/07/08	01/07/08
Osteospermum	40	JMF	21/06/08 al 28/05/08	01/07/08	01/07/08
Clavellina	40	JMF	21/06/08 al 28/05/08	01/07/08	01/07/08
Vinca	40	JMF	21/06/08 al 28/05/08	01/07/08	01/07/08
Eustoma	40	JMF	21/06/08 al 28/05/08	01/07/08	01/07/08

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

Se solicitaron 40 explantes de cada una de las especies, para tener diez explantes por tratamiento.

Cuadro 24. Cuadro de productos y dosis aplicadas por finca.

Finca	Productos	Dosis
JMF (Amatitlán)	Octave	0.5 gr./Litro
	Rovral	1 gr./litro
	Octave	0.5 gr./Litro
Las Vertientes (Pinula)	Rovral	1 gr./ litro
	Ridomil/Gold Plus	3 gr./ litro
	Kocide	1 gr./ litro
Esquejes (Jalapa)	Dithane	1 gr./litro
	Dithane + Amistar	1 gr./litro 0.5 gr./litro

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

Cuadro 25. Tratamientos utilizados

Tratamiento	Desinfectantes	Tiempos
Tratamiento 1 (Testigo)	Etanol al 70% durante 30 seg. NaClO Comercial 10% + 20 gotas de Tween20	10 minutos.
Tratamiento 2	Etanol al 70% durante 30 seg. NaClO Comercial 10% + 20 gotas de Tween20	15 minutos.
Tratamiento 3	Etanol al 70% durante 30 seg. NaClO Comercial 10% + 20 gotas de Tween20	20 minutos.
Tratamiento 4	Etanol al 70% durante 30 seg. NaClO Comercial 10% + 20 gotas de Tween20	25 minutos.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

b. Protocolo de desinfección de los explantes

- La desinfección de los explantes se inició desinfectando la mesa de trabajo se llenaron los frascos con Etanol al 70% y con NaClO Comercial 10% + 20 gotas de Tween 20, estos fueron identificados con cinta en la tapadera para reconocer cada uno de los tratamientos.
- El personal encargado adecuadamente vestido (bata, gorro y guantes), abrió las bolsas plásticas en donde venían los explantes, se revisó la etiqueta plástica en la que se indicaba el nombre de la especie y el número de explantes que contenía.



Figura 39. Personal adecuadamente vestido.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

- Los explantes se sacaron y contaron para comprobar que estuvieran completos, se tomaron diez explantes por tratamiento, de los cuales cinco se cortaron a un tamaño aproximado de 2 cm. y los otros cinco a un tamaño de 4 cm.



Figura 40. Dos tamaños diferentes de explantes A. 4.5 cm. B. 2.0 cm.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

- Los explantes se sumergieron en un frasco de vidrio, que contenía Etanol al 70 %, se activó el cronometro al momento de la inmersión, pasados 30 seg. se sacaron del Etanol y se pusieron a secar en hojas de papel mayordomo, esto se repitió en todos los tratamientos.

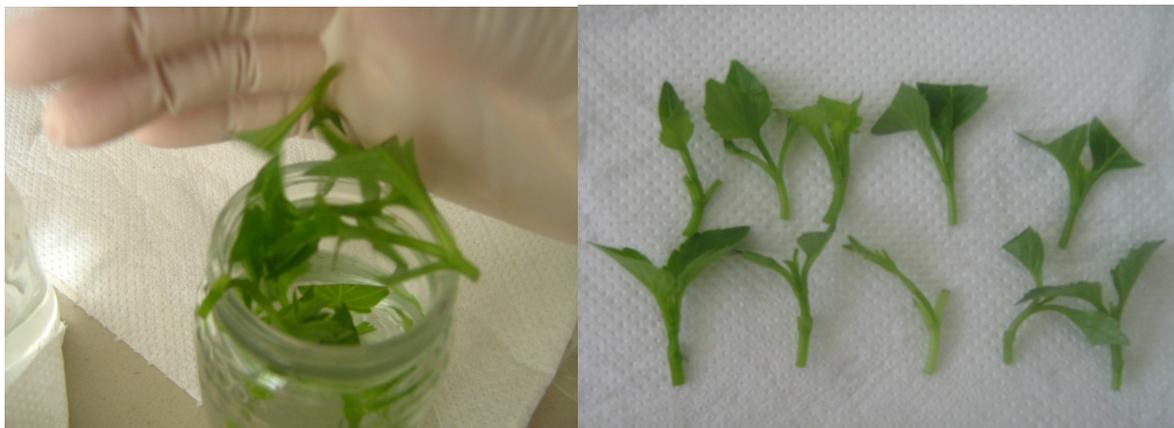


Figura 41. Explantes sumergidos en Etanol al 70% y colocados en papel mayordomo

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

- Cuando los explantes se secaron, se sumergieron en una solución de NaClO comercial al 10% con 20 gotas de Tween 20, durante 10 min, para el tratamiento 1 (testigo) y 15, 20 y 25 minutos, para los tratamientos 2, 3 y 4, el frasco estuvo en agitación constante.

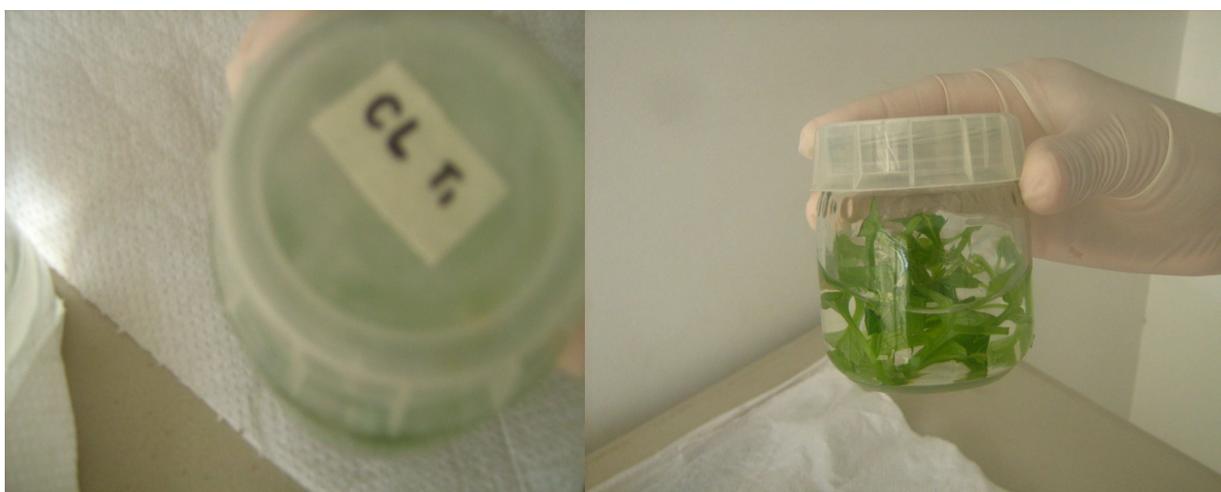


Figura 42. Explantes sumergidos en hipoclorito de sodio al 10%, en diferentes tiempos.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

- Al finalizar cada tratamiento los explantes se lavaron tres veces sumergiéndolos en agua desmineralizada estéril, por aproximadamente un minuto para retirar el exceso de desinfectante, con esto se evita que se continúe dañando el tejido.
- Los explantes ingresaron al laboratorio en el frasco donde se realizó el tercer lavado, para ser secadas de nuevo en papel mayordomo estéril, posteriormente se eliminan con bisturí las partes dañadas por el tratamiento.
- Cuando estuvieron listos se sembraron en medio de cultivo básico (agar + agua estéril), donde permanecieron 10 días.



Figura 43. Secado y siembra de explantes en medio de cultivo.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

- Las plantas permanecieron en observación 10 días, se reviso cada tubo para descartar las contaminadas o dañadas por el tratamiento, las que se consideraron limpias visualmente se evaluaron en agar nutritivo, esto se hizo colocando pequeños pedazos de la planta en un medio nutritivo, con esta prueba podemos determinar si la planta está completamente limpia de hongos y bacterias.

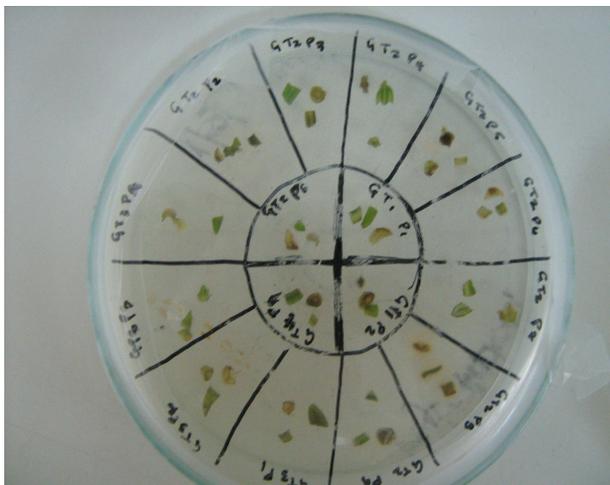


Figura 44. Test en agar nutriente, observación constante para determinar contaminación.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

3.2.3 Resultados

Cuadro 26. Resultados de los tratamientos

Especie	Tratamiento	# de plantas	Contaminados o quemadas	Limpias en agar nutriente	% de explantes limpios
Gazania	Trat 1	10	8	1	10%
	Trat 2	10	4	6	60%
	Trat 3	10	4	6	60%
	Trat 4	10	7	3	30%
Rudbeckia	Trat 1	10	8	2	20%
	Trat 2	10	7	3	30%
	Trat 3	10	7	3	30%
	Trat 4	10	5	5	50%
Verbena	Trat 1	10	8	2	20%
	Trat 2	10	9	1	10%
	Trat 3	10	8	2	20%
	Trat 4	10	3	7	70%
Pensamiento	Trat 1	10	8	2	20%
	Trat 2	10	7	3	30%
	Trat 3	10	10	0	0%
	Trat 4	10	10	0	0%
Pentas	Trat 1	10	10	0	0%
	Trat 2	10	10	0	0%
	Trat 3	10	10	0	0%
	Trat 4	10	7	3	30%
Begonia	Trat 1	10	9	1	10%
	Trat 2	10	10	0	0%
	Trat 3	10	10	0	0%
	Trat 4	10	10	0	0

Continuación del cuadro 26

Especie	Tratamiento	# de plantas	Contaminados o quemadas	Limpias en agar nutriente	% de explantes limpios
China	Trat 1	10	10	0	0%
	Trat 2	10	10	0	0%
	Trat 3	10	10	0	0%
	Trat 4	10	10	0	0%
Dahlia	Trat 1	10	3	7	70%
	Trat 2	10	8	2	20%
	Trat 3	10	9	1	10%
	Trat 4	10	9	1	10%
Osteospermum	Trat 1	10	1	9	90%
	Trat 2	10	5	5	50%
	Trat 3	10	6	4	40%
	Trat 4	10	9	1	10%
Clavellina	Trat 1	10	1	9	90%
	Trat 2	10	5	5	50%
	Trat 3	10	7	3	30%
	Trat 4	10	8	2	20%
Penstemon	Trat 1	10	0	10	100%
	Trat 2	10	0	10	100%
	Trat 3	10	0	10	100%
	Trat 4	10	0	10	100%
Eustoma	Trat 1	10	0	10	100%
	Trat 2	10	0	10	100%
	Trat 3	10	0	10	100%
	Trat 4	10	6	4	40%

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

3.2.4 Conclusiones y recomendaciones.

- En respuesta a los objetivos planteados se presenta el cuadro No 27, en este se puede observar, la especie, el tratamiento que presentó mejor resultado para la misma y el porcentaje de plantas limpias después de la prueba de agar nutriente.

Cuadro 27. Mejor tratamiento por especie

Especie	Tratamiento	%	Recomendación
Gazania	Tratamiento 2	60 %.	Se recomienda el tratamiento 2 ya que requiere de menos tiempo y proporciona los mismos resultados que el tratamiento 3
	Tratamiento 3	60 %	
Rudbeckia	Tratamiento 4	50 %	El tratamiento 4 es el más recomendable para este tipo de plantas debido a que las vellosidades que la cubren, hacen difícil la penetración de los productos en periodos cortos de tiempo.
Verbena	Tratamiento 4	70 %	Se recomienda el tratamiento 4 ya que fue el más efectivo en la desinfección de los explantes de Verbena.
Dahlia	Tratamiento 1	70 %	Es el tratamiento más rápido y no provoca mayor daño a las plantas.
Clavellina	Tratamiento 1	90%	El tratamiento 1 es el recomendable para la desinfección de esquejes de Clavellina, este además de proporcionar un alto porcentaje de plantas desinfectadas es el más rápido y no hubo plantas quemadas.
Penstemon	Tratamiento 1, 2,3,4	100%	No hubo contaminación en ninguno de los tratamientos, se recomienda el uso del tratamiento 1 por ser el más rápido.
Osteos	Tratamiento 1	90%	Se recomienda el uso del tratamiento 1, por ser el más rápido y eficaz en la desinfección de Osteospermum.
Eustoma	Tratamiento 1 Tratamiento 2 Tratamiento 3	100%	No hubo contaminación en ninguno de los tres tratamientos, se recomienda el uso del tratamiento 1 por ser el más rápido.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

- Para obtener un protocolo confiable para cada especie, es necesaria la constante experimentación con diferentes desinfectantes y tiempos de inmersión, se debe tomar en cuenta también que debido a las diferencias anatómicas y morfológicas de cada especie no todas responderán de la misma forma a un solo tratamiento, por lo que en este caso no fue posible establecer un solo tratamiento para todas las especies.

Aunque los tratamientos utilizados en este experimento no fueron efectivos para las trece especies, se obtuvieron buenos resultados en ocho de estas, produciendo en algunos casos el 100% de efectividad.

- Se recomienda el uso de estos tratamientos para las especies que tengan por lo menos un 60% de plantas limpias, en el caso de plantas como la China (*Impatiens sp*) y Begonia (*Begonia sp.*), que son suculentas, se recomienda menor tiempo de exposición al tratamiento ya que estas murieron por quemadura de la planta y no por contaminación.

3.3. Prueba de Etanol + Agua desmineralizada y Etanol + Agua desmineralizada estéril, para iniciación.

3.3.1 Objetivos

General

Determinar la eficiencia del etanol al 70% como único desinfectante en tres especies.

Específicos.

- Observar el efecto de cuatro tiempos de inmersión de etanol al 70 % en la desinfección de explantes en diferentes tiempos.
- Establecer la diferencia entre el uso de etanol al 70% con H₂O desmineralizada y etanol al 70% con H₂O desmineralizada estéril.

3.3.2 Metodología

a. Selección y Solicitud de Material Vegetal

- 80 esquejes de Verbena (*Verbena hybrida*)
- 80 esquejes de Osteospermum. (*Osteospermum* sp.)
- 80 esquejes de Vinca. (*Catharanthus roseus*)

b. Tratamientos.

Se aplicaron un total de 8 tratamientos de 10 plantas cada uno.

Cuadro 28. Tiempos de inmersión en etanol + agua desmineralizada estéril al 70 %

Tratamiento	Solución	Tiempo
Tratamiento 1	Etanol + H ₂ O desmineralizada estéril al 70 %	15 segundos
Tratamiento 2	Etanol + H ₂ O desmineralizada estéril al 70 %	30 segundos
Tratamiento 3	Etanol + H ₂ O desmineralizada estéril al 70 %	45 segundos
Tratamiento 4	Etanol + H ₂ O desmineralizada estéril al 70 %	60 segundos

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

Cuadro 29. Tiempos de inmersión en etanol + agua desmineralizada al 70 %

Tratamiento	Solución	Tiempo
Tratamiento 1	Etanol + H ₂ O desmineralizada al 70 %	15 segundos
Tratamiento 2	Etanol + H ₂ O desmineralizada al 70 %	30 segundos
Tratamiento 3	Etanol + H ₂ O desmineralizada al 70 %	45 segundos
Tratamiento 4	Etanol + H ₂ O desmineralizada al 70 %	60 segundos

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

c. Preparación de diluciones.

- **Etanol + agua desmineralizada estéril:** para realizar la prueba se preparó un litro de Etanol al 70 %, se agregaron 729 ml de Etanol al 96% y 271 ml de agua desmineralizada, previamente esterilizada en autoclave durante 20 min. en un erlenmeyer de 1000 ml.
- **Etanol + agua desmineralizada:** para realizar la prueba se preparó un litro de Etanol al 70 %, se agregaron 729 ml de Etanol al 96% y 271 ml de agua desmineralizada en un erlenmeyer de 1000 ml.

d. Llenado de frascos estériles: teniendo las diluciones, se llenaron los frascos estériles identificados de acuerdo al tratamiento, teniendo tres frascos para cada uno de los 8 tratamientos para un total de 24 frascos.



Figura 45. Frascos estériles e identificados para tratamiento.

Fuente: Fotografía Cedillo G3mez, P.A. 2008

e. Recepci3n y limpieza de las plantas: las plantas de Vinca, Verbena y Osteospermum se sacaron de las bolsas y se colocaron sobre papel mayordomo donde se les retir3 el exceso de hojas y se redujo el tama1o de los explantes hasta aproximadamente 3 cm.



Figura 46. Conteo y limpieza de esquejes para tratamiento

Fuente: Fotografía Cedillo G3mez, P.A. 2008

f. Aplicación de los tratamientos: se sumergieron 10 esquejes de cada especie en cada uno de los frascos identificados, se realizaron los cuatro tratamientos con la dilución de etanol al 70% + agua desmineralizada de acuerdo a los tiempos establecidos (ver cuadros 28) y los cuatro tratamientos con la dilución de etanol al 70% + agua desmineralizada estéril (Ver cuadro 29), terminado el tiempo de inmersión se eliminó el líquido y se taparon de nuevo los frascos para que ingresaran al laboratorio.



Figura 47. Aplicación del tratamiento

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

g. Secado y siembra: dentro del laboratorio los esquejes se secaron en papel mayordomo estéril, se les cortaron las hojas quemadas y se sembraron en los tubos identificados de acuerdo al tratamiento y la especie.



Figura 48. Limpieza y siembra de esquejes

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, PA 2008

h. Tiempo de observación y prueba en agar nutriente

Los esquejes permanecieron en observación 10 días, pasado el tiempo de observación se eliminaron los contaminados y se realizó la prueba en agar nutriente.



Figura 49. Plantas de Osteospermum en observación, planta contaminada con hongos, quemaduras por el tratamiento.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

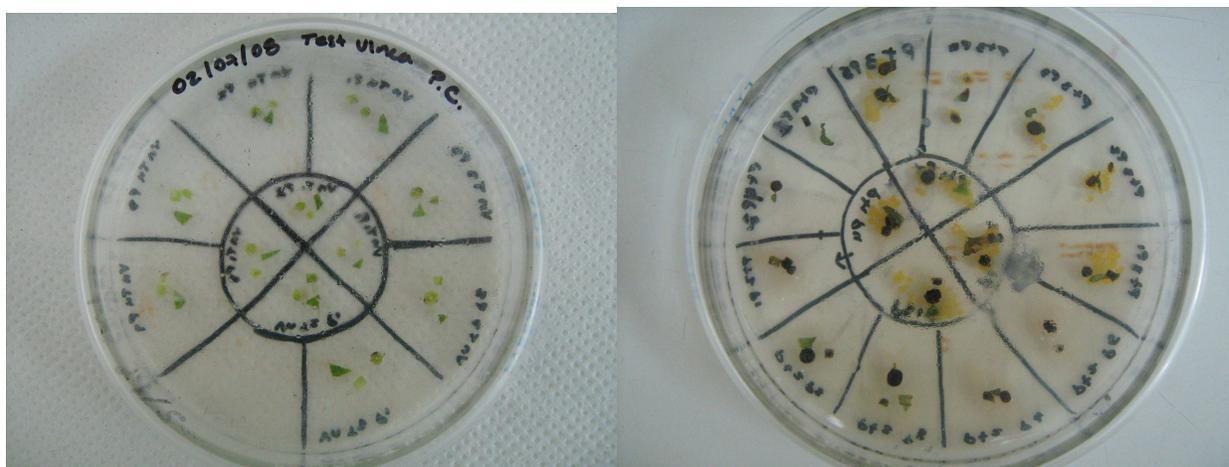


Figura 50. Test en agar nutriente, se mantuvieron en observación constante.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

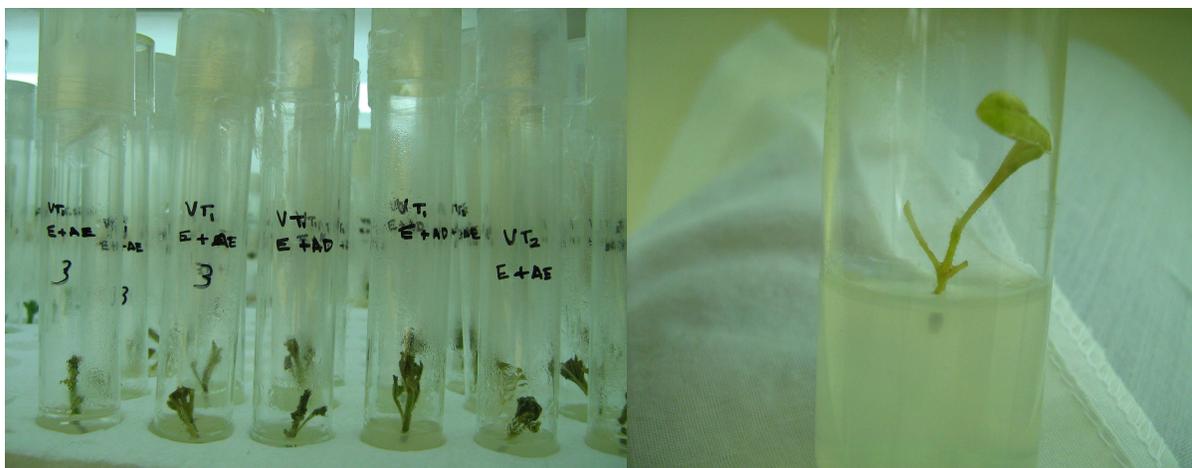


Figura 51. Plantas de Verbena quemadas, en todos los tratamientos.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

3.3.3 Resultados

Cuadro 30. Plantas limpias después del tratamiento

Especie	Tratamiento	Plantas limpias en Etanol + Agua estéril		Plantas limpias en Etanol + Agua desmineralizada	
		Visualmente	Agar nutriente	Visualmente	Agar nutriente
Verbena	Tratamiento 1 = 15 seg.	0		0	
	Tratamiento 2 = 30 seg.	0		0	
	Tratamiento 3 = 45 seg.	0		0	
	Tratamiento 4 = 60 seg.	0		0	
Osteos					
	Tratamiento 1 = 15 seg.	4	0	9	5
	Tratamiento 2 = 30 seg.	7	6	8	8
	Tratamiento 3 = 45 seg.	7	5	6	6
	Tratamiento 4 = 60 seg.	8	8	9	7
Vinca	Tratamiento 1 = 15 seg.	6	5	2	2
	Tratamiento 2 = 30 seg.	5	4	3	3
	Tratamiento 3 = 45 seg.	4	4	2	0
	Tratamiento 4 = 60 seg.	1	1	6	4

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

3.3.4 Conclusiones y recomendaciones

Cuadro 31. Tratamiento más efectivo por especie

Especie	Tratamiento	Efectividad	Recomendación
Vinca	Tratamiento 1: Etanol + Agua desmineralizada estéril al 70% durante 15 segundos.	50 %	Este tratamiento resultó el más efectivo, además de ser el más rápido, la cantidad de plantas quemadas fue poca.
Osteos	Tratamiento 2: Etanol + Agua desmineralizada al 70% durante 30 segundos. Tratamiento 4: Etanol + Agua desmineralizada estéril al 70 % durante 60 seg	80 %	Aunque los dos tratamientos proporcionaron la misma cantidad de plantas limpias, para fines de desinfección de esquejes se recomienda el Tratamiento 2 de Etanol + agua desmineralizada al 70% por ser el más rápido.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A.

- Se observaron mejores resultados en la esterilización con agua desmineralizada estéril, sin embargo para fines de desinfección es poco práctico y caro debido al tiempo y gasto de energía que conlleva el uso del autoclave, por lo que se recomienda que si el material es de mucha importancia y resulta difícil de conseguir, se tome la precaución de esterilizar el agua desmineralizada, de lo contrario, es recomendable esterilizar el material y tener los cuidados necesarios en el proceso.
- Para la desinfección de explantes de *Osteospermum* (*Osteospermum sp*) el tratamiento de Etanol al 70 % durante 30 y 60 seg. proporcionó el 80% de plantas limpias por lo que no se considera necesario utilizar otro desinfectante.
- En las plantas de *Vinca* (*Catharanthus roseus*), se obtuvo solamente el 50 % de las plantas limpias, por esto se hace necesario la aplicación de otro desinfectante como el hipoclorito de sodio, ya que con esto nos aseguraríamos tener un mayor número de plantas limpias en el proceso de iniciación.

3.4.1 Identificación de la especie de *Alternaria* que ocasiona problemas en cultivos de *Zinnia*

3.4.2 Objetivos

General

Identificar la especie de *Alternaria* que contamina la semilla de *Zinnia*. (*Zinnia elegans*)

Específico

Conocer las principales características de la especie a identificar

3.4.3 Metodología

- a. **Obtener una muestra del patógeno:** la muestra fue se una de las cajas que se utilizan para hacer el test de *Alternaria* en semilla de *Zinnia*, esta se llevo al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.
- b. **Metodología realizada en el laboratorio de la FAUSAC:** teniendo la muestra se realizó la consulta con el Ing. Agr. Gustavo Álvarez, Fitopatólogo de la FAUSAC.
- c. **Observación en el microscopio:** se hicieron varios montajes utilizando agujas de disección finas, colocando la muestra en lactofenol claro, se observo una conidia solitaria de *Alternaria* sp.
- d. **Identificar el patógeno por medio de claves:** teniendo en cuenta las características de la especie y su principal hospedante, se procedió a la identificación de la misma, utilizando claves taxonómicas.

3.4.5 Resultados

a. Taxonomía:

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes.

Subclase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Especie: *A. zinniae*

Nombre binomial: *Alternaria zinniae* (Wikipedia 2010)

b. Descripción inicial de la especie.

El patógeno más común en las plantas de Zinnia es *Alternaria zinniae* Pape, un hongo que se describe en el 1942. El primer informe publicado sobre la enfermedad en los Estados Unidos apareció en 1943, pero es probable que se presente en el país desde 1924 cuando manchas de la hoja de Zinnia causadas por *Alternaria* sp. Fueron colectadas en Lake Alfred, Florida (Wehlbur 1969).

c. Síntomas

Manchas grandes casi redondas con un centro necrótico gris o en ocasiones blanco, esta parte a menudo desaparece dejando un agujero en el centro de la mancha. Cuando está muy infectada las hojas se vuelven marrones y secas con tendencia a agrietarse. (Ver figura 52). *Alternaria zinniae* también puede infectar los tallos, peciolo y flores pero estos síntomas no son tan visibles como en las hojas (Wehlbur 1969).

d. Características de la especie.

- Micelio Inmerso.
- Conidioforo solitario o en fascículos.
- Tamaño por encima de 150 μ de longitud
- Conidia solitaria raramente en cadenas de 2.
- Varios septos longitudinales.
- Pico filiforme.



Figura 52. Conidia de (*Alternaria zinniae*) 40x

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

Otros hospedantes

Bidens, Caléndula, Crisantemos, Dahlia, Gerbera, Heliantus.



Figura 53. Planta de Zinnia contaminada con *Alternaria zinniae*

Figura 54. Semilla de Zinnia contaminada con *Alternaria zinniae*

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

3.4.6 Conclusiones y recomendaciones.

1. La especie de *Alternaria* que contamina las semillas de Zinnia es *Alternaria zinniae* H. Pape ex M.B. Ellis 1972
2. La principal característica de esta especie es su pico filiforme, que la distingue de las otras conidias identificadas como patogénicas, tiene varios septos longitudinales, este hongo generalmente se presenta asociado a *Cercospora zinniae*, debido a que en la empresa ya se encuentra presente el hongo, se recomienda hacer pruebas para el control del mismo debido a que en la empresa se trabaja con especies hospedantes como la Dahlia y Crisantemos, de esta manera se evita la propagación del hongo.

3.5 Identificación del Agente causal de Pierna Negra en Geranio

3.5.1 Objetivos

General

Identificar el agente causal de la Pierna Negra en plántulas de Geranio.

Específico

Aislar el patógeno que ocasiona la Pierna negra en Geranio.

3.5.3 Metodología

a. Desinfección y Siembra en PDA y CMA: antes de sembrar los segmentos infectados en el agar de PDA y CMA se procedió a realizar el tratamiento de desinfección con cloro al 10% probando cuatro tiempos diferentes los tiempos fueron: 15 seg., 30 seg., 45 seg., y 60 seg.

b. Inoculación del hongo en manzanas verdes: teniendo como base que el agente causal de “Pierna negra” en plantas de Geranio podría tratarse de *Phytophthora* o *Pythium*, los cuales se encuentran frecuentemente en el suelo, se realizó el aislamiento utilizando manzanas verdes como cultivo trampa, estas permanecieron en cámara húmeda tres días, y se inocularon con diferentes partes de la planta de Geranio de la siguiente forma:

Manzana 1: Inoculada con suelo.

Manzana 2: Inoculada con tallo.

Manzana 3: Inoculada con raíces.

Manzana 4: Inoculada con micelio obtenido de tubos de PDA.



Figura 55. Planta enferma de Geranio y frutos de manzanas inoculadas con partes de tallo, raíces y suelo de Geranios con pierna negra

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

c. Inoculación en planta de Geranio: para realizar la inoculación en la planta de Geranio, se obtuvo una sección de la zona de avance de la manzana inoculada con suelo, y con la ayuda de un hilo se amarró la sección afectada de la manzana, al tallo sano de la planta de Geranio y se observó. Ver figura 56.

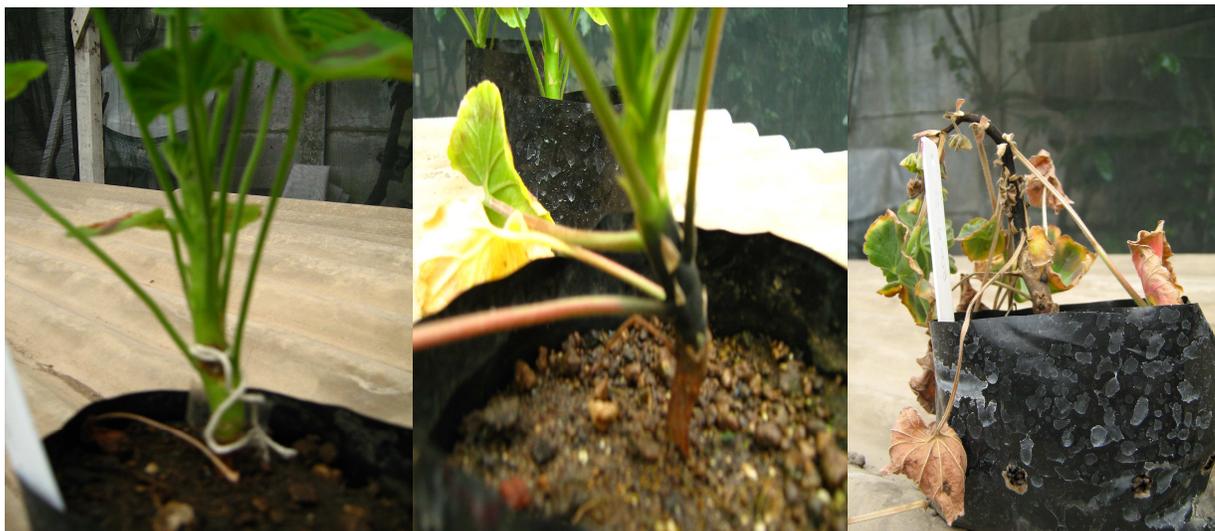


Figura 56. Geranio 25 de Junio, Geranio 12 de Julio, Geranio 30 de Julio.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

d. Siembra en caja de PDA con y sin hymexasol: una de las pruebas sugeridas en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía fue el uso del medio PDA con el fungicida hymexasol, para realizar la prueba se extrajeron 10 pedazos pequeños de la zona de avance de la manzana inoculada con suelo y se sembraron 5 pedacitos en una caja de PDA que contenía hymexasol y 5 pedacitos en una caja de PDA sin hymexasol, se esperó 3 días y únicamente se observó crecimiento de micelio en la caja de PDA sin hymexasol, las dos cajas fueron llevadas a la Facultad de Agronomía al laboratorio de fitopatología, donde se nos sugirió la prueba, allí se nos indicó que el hymexasol es un inhibidor del crecimiento de *Pythium* sp. por lo que en la caja que contenía hymexasol solamente podría crecer *Phytophthora* sp. lo cual no ocurrió, por lo que se descartó la posibilidad de que el patógeno que afectaba las plantas de Geranio fuera *Phytophthora* sp.

e. Prueba de cámara de agua: Esta prueba fue sugerida por el Dr. David Monterroso, fitopatólogo de la Facultad de Agronomía, para la misma se solicitaron 2 plantas de Geranio que mostraran síntomas de pierna negra, estas plantas se lavaron para retirarles el suelo y se les retiraron las hojas, dejando únicamente una pequeña parte de las raíces y el tallo completo, el cual fue sumergido en agua estéril, en beackers de 80 ml. y sostenidas con un clip metálico.



Figura 57. Tallos y raíces de Geranio enfermo en agua, para observar crecimiento de micelio.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008



Figura 58. Prueba de Geranio en agua dos días después.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

f. Aislamiento de micelio de cámara de agua: transcurridos dos días de iniciada la prueba, se observó un micelio que creció sobre el agua, de este micelio que se encontraba pegado al tallo con mucho cuidado se tomó una muestra la cual se colocó en un medio de agar nutriente con jugo de tomate.

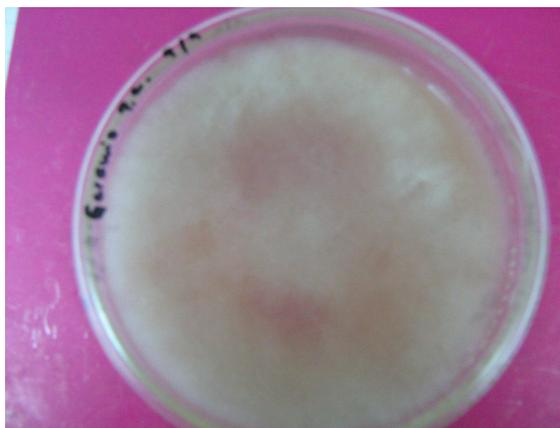


Figura 59. Siembra de micelio en agar de jugo de tomate.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, PA 2008

La caja de medio preparado con jugo de tomate, se llevó a la Facultad de Agronomía para obtener un diagnóstico, allí se realizaron montajes y se tomaron las siguientes fotografías.

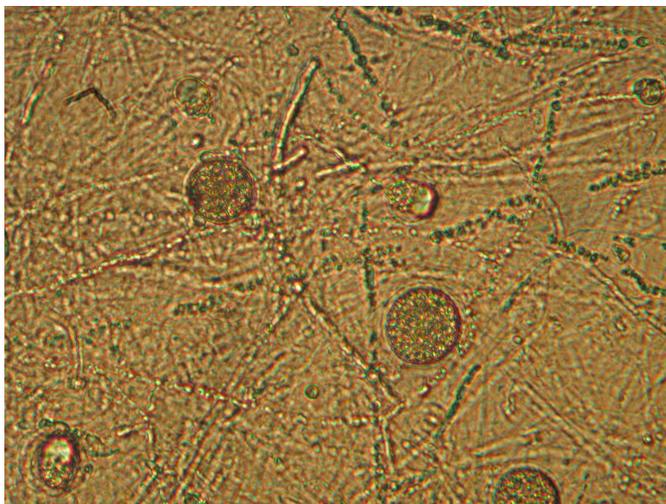


Figura 60. Montaje de micelio de cultivo de jugo de tomate 40x

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, PA 2008

3.5.4 Resultados

De acuerdo a las pruebas realizadas y al tipo de esporulación que tuvo el hongo se determinó que este pertenece a la siguiente taxonomía:

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Género: *Pythium sp.* (Wikipedia 2010)

Características del género:

El micelio produce esporangios terminales o de forma esférica. Los esporangios germinan directamente y producen de uno a varios tubos germinales, o bien forman una hifa corta en el extremo de la cual se forma una vesícula. El protoplasma se difunde desde el esporangio hacia la vesícula y de ahí forma más de cien zoosporas (Bayer Crops Cience Pe. 2008).

Daños

El hongo invade el sistema vascular de las raíces y se distribuye por la planta a través de los vasos, obstruyéndolos e impidiendo ascender la savia proveniente de las raíces. Las hojas se vuelven flácidas y se necrosan, y con el paso del tiempo coloniza toda la planta. Aparece un amarillamiento en un sector lateral de las hojas, y a lo largo del tallo una necrosis, acompañada de unas secreciones gomosas. También hay una reducción del desarrollo de la planta en comparación a las plantas sanas. Los ataques en plántula generalmente son letales (Bayer Crops Cience Es. 2008).



Figura 61. Vesícula llena de zoosporas.

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, PA 2008

3.5.5 Conclusión

De acuerdo a la identificación realizada y contando con la supervisión de los fitopatólogos de la Facultad de Agronomía Dr. David Monterroso, Dr, Edin Orozco, Ing. Agr. Gustavo Álvarez, podemos decir que el agente causal de la “Pierna negra en Geranio” es el hongo *Pythium* sp por las múltiples características que lo hacen reconocible, como lo podemos observar en las fotografías anteriores, la más fácil de identificar es su vesícula delgada llena de zoosporas, que se liberan lentamente, y la invaginación que esta crea al momento de la esporulación.

3.6 Determinación del hongo causante de contaminación de polen y cabezuelas de Marigold (*Tagetes erecta* L) Flor de muerto.

3.6.1 Objetivos.

General

Determinar si el polen de Marigold (*Tagetes erecta* L) se encontraba contaminado.

Específico

- Identificar los principales hongos que ocasionan la contaminación de polen y cabezuelas en plantas de Marigold. (*Tagetes erecta* L)
- Aislar los hongos para realizar antibiogramas

3.6.2 Metodología

a. Colocar polen de Marigold en medio PDA y CMA para observar la contaminación.

El polen de Marigold fue colocado en cajas con medio PDA y CMA medios especiales para la observación de hongos el primero a base de extracto de papa y el segundo extracto de maíz, a las 24 hrs. de sembrado el polen se observo la contaminación de este, especialmente en el medio de PDA.

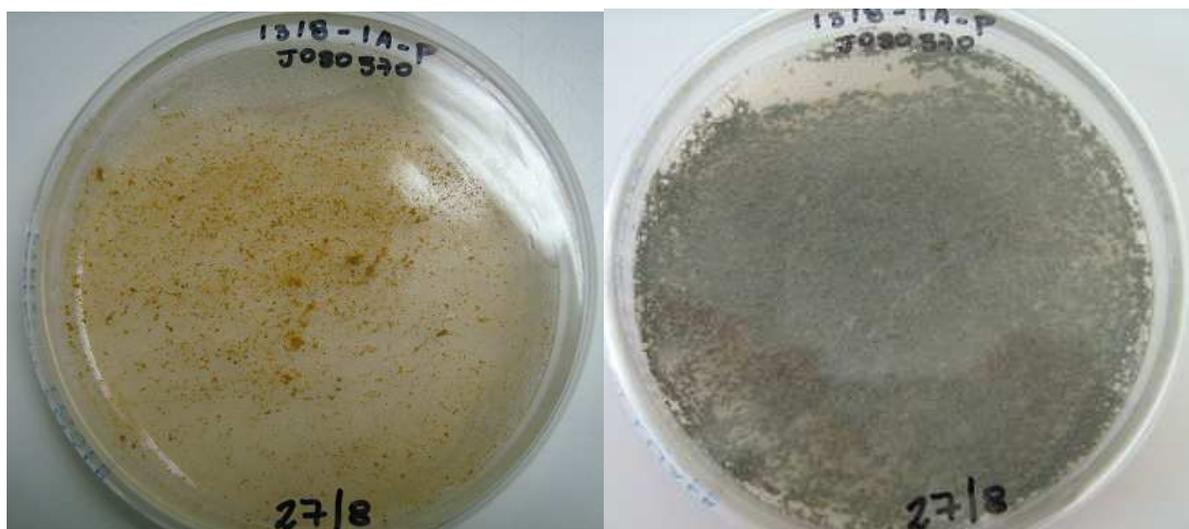


Figura 62. Polen día de la siembra.

Figura 63. Polen a las 24 hrs. de la siembra

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

b. Observación de polen en el microscopio. al observar la contaminación del polen en los medios de PDA y CMA se tomaron muestras de los hongos para su identificación, los montajes se observaron a 10x, 20x y 40x.

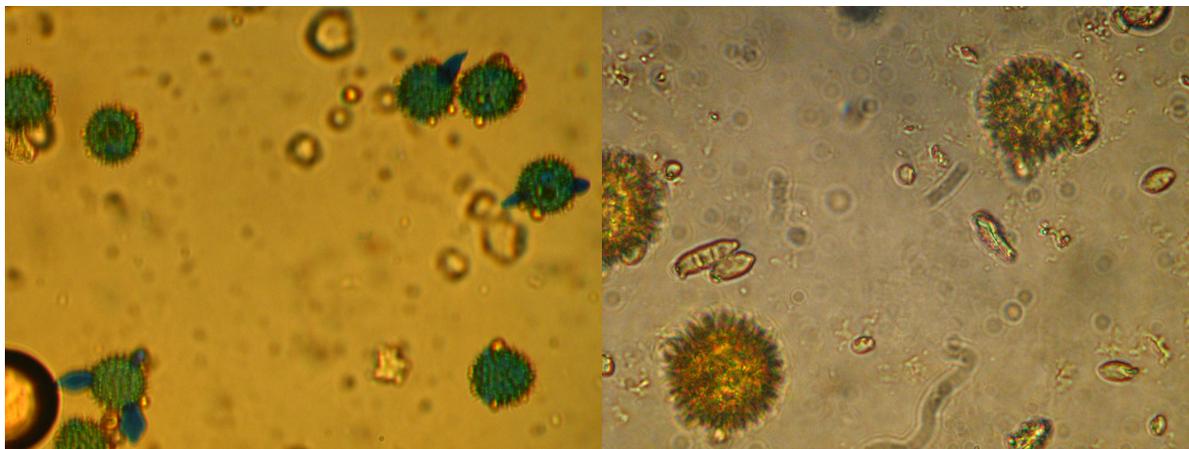


Figura 64. Polen en observación 20x. y polen en observación 40x

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, PA 2008

c. Colocar las cabezuelas en cámara húmeda. Las cabezuelas de Marigold fueron colocadas en cajas petrí sobre cartón húmedo, con la finalidad de poder observar claramente el micelio que contamina de la cabezuela.



Figura 65. Cabezuela contaminada, contaminación por *Botrytis sp.*

Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, P.A. 2008

d. Identificación del agente causal: la identificación fue realizada por el Dr. Edin Orozco, en una consulta profesional a la empresa “Jardines Mil Flores S.A”, el resultado se entregó al Dr. Fredy Romero, jefe del departamento de investigación y desarrollo de la empresa, quien a su vez nos proporcionó la información, para identificar correctamente el hongo y realizar el aislamiento del mismo.

e. Aislamiento de los principales agentes contaminantes en medios de PDA: ya identificados principales agentes causales de la contaminación se procedió al aislamiento de *Cladosporium* sp. el cual fue aislado de las cajas de PDA (papa, dextrosa y agar) que contenían el polen y *Botrytis* sp. aislado de las cabezuelas de Marigold.



Figura 66. Aislamiento de *Cladosporium* sp. Figura 10. Aislamiento de *Botrytis* sp.
Fuente: Fotografía Cedillo Gámez, PA 2008

3.6.3 Conclusiones

De acuerdo a las observaciones y a la determinación realizada por el Dr. Edin Orozco, se pudo identificar que los agentes causales de la contaminación en el polen de Marigold eran *Cladosporium* sp. y *Botrytis* sp.

Se realizó el aislamiento del micelio en PDA para tener un cultivo puro del hongo para hacer evaluaciones *in vitro* de fungicidas, de esta manera se esperaba encontrar un fungicida que controlara el hongo.

3.7 Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Cladosporium* sp., *Botritis* sp. *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp.

3.7.1 Objetivos

General

Probar la eficacia de varios fungicidas para el control de los hongos.

Específicos.

Identificar cual o cuales fungicidas proporcionan mejor resultado para el control de los hongos *Cladosporium* sp., *Botritis* sp., *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp.

3.7.2 Metodología

Protocolo para preparación antibiogramas, Laboratorio de Fitopatología JMF.

- a. Aislamiento y crecimiento del hongo que se desea evaluar.
- b. Desinfectar perfectamente la campana de flujo laminar. D-amonio(10cc/litro) y Etanol al 95% + spray desinfectante.
- c. Identificar las cajas estériles y los erlenmeyer con el nombre o las iniciales del producto químico, su dosis y la fecha en que se realiza la prueba. Verificar que todo este correctamente identificado.
- d. Preparar volumen de medio para realizar la evaluación *in vitro* de fungicidas. PDA acido para evaluación de hongos. Volumen a preparar (Número de tratamientos x 200 ml) + 200 ml de los dos controles.
- e. PDA ácido (Para cultivo libre de bacterias)

Reactivo	Dosis
Caldo de papa	1 litro
Dextrose (Glucosa)	3.75gr. / Litro.
Agar, Agar	20 gr.
- f. Después de autoclavar

Neomycin Sulfate	1 ml.
Streptomycin Sulfate	2 ml.
Acid Lactic	2 ml.
- g. Autoclavar el medio de cultivo.
- h. Pesar las dosis indicadas de los fungicidas granulados y en polvo.

- i.** Al salir el medio del autoclave, y aun caliente se le agregan al medio las dosis de Acido Láctico, Sulfato de Neomicina y Sulfato de Estreptomicina, se debe agitar vigorosamente y posteriormente se le agregan las dosis a evaluar de fungicida. Agitar rápida y vigorosamente para que se homogenice bien.
- j.** Teniendo el medio bien homogenizado se procede a verter en las 6 cajas asignadas para el tratamiento tomando en cuenta:
 - a. 4 cajas inoculadas 2 sin inocular para control.(200 ml)
 - b. 4 cajas control absoluto, solo con medio, sin químicos, sin inocular.(100 ml)
 - c. 4 cajas control relativo, solo con medio, sin químicos, inoculadas (100 ml)
- k.** Dejar cuajar en las cajas y esperar tres días para verificar que no estén contaminadas.
- l.** Al tercer o cuarto día realizar la inoculación del hongo en cultivo puro, en la campana de flujo laminar, desinfectada perfectamente con el proceso del inciso 2. Recordar que solamente se inoculan 4 cajas de cada tratamiento.
- m.** Sellar las cajas.
- n.** Dejar en incubación.
- o.** Observar a los 8 días y entregar resultados.

3.7.3 Resultados

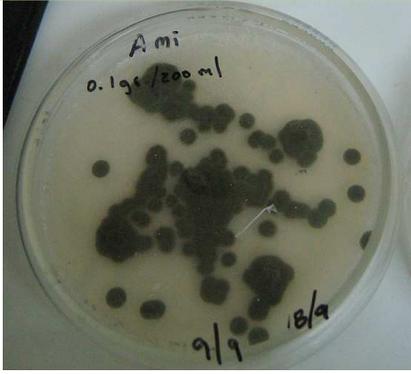
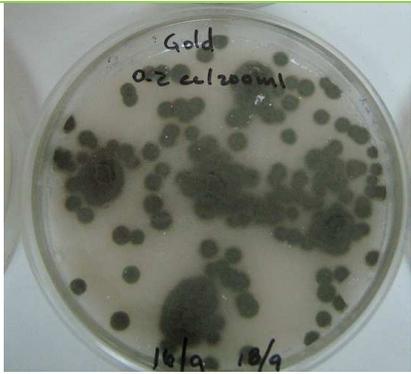
Evaluación de fungicidas *Cladosporium* sp.Cuadro 32. Evaluación de fungicidas para control de *Cladosporium* sp.

Producto	Ingrediente Activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Siganex 600 SC	Pyrimethanil	0.5cc/litro	Bueno	
Dithane 80 WP	Mancozeb	1 gr./litro	Bueno	
Timorex	<i>Melaleuca alternifolia</i>	5 cc/litro	Bueno	
Octave 50 WP	Prochloraz	0.5 gr./litro	Regular	

Continuación cuadro 32

Producto	Ingrediente Activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Bravo 720 SC	Clorotalonil 72%	1.5 cc/litro	Regular	
Nativo 300 SC	Tebuconazol	0.3 cc./litro	Regular	
Bellis 38 WG	Boscalid + Pyraclostrobin	0.5 cc/litro	Regular	
Rovral 50 WP	Iprodiona	1 gr./litro	Regular	

Continuación cuadro 32

Producto	Ingrediente Activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Amistar 50 WG	Azoxistrobin	0.5 gr./litro	Malo	
Goldazim 50 SC	Carbendazim	0.5 cc/litro	Malo	
Goldazim 50 SC	Carbendazim	1 cc/litro	Malo	
Decree 50 WDG	Fenhexamid	1 gr./litro	Malo	

Fuente: Cedillo Gámez, P.A. 2008

Evaluación de fungicidas para *Botrytis* sp.Cuadro 33. Evaluación de fungicidas para control de *Botrytis* sp.

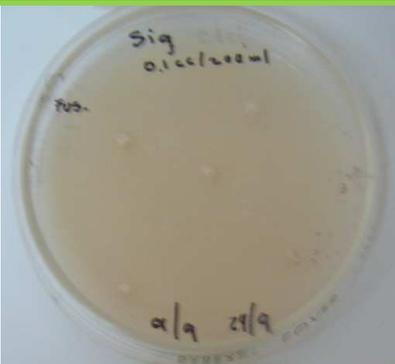
Producto	Ingrediente activo	Dosis	Resultados	Fotografía
Octave 50 WP	Prochloraz	0.5 gr./litro	Bueno	
Rovral 50 WP	Iprodiona	1 gr./litro	Regular	
Bravo 720 SC	Clorotalonil 72%	1.5 cc/litro	Regular	
Decree 50 WDG	Fenhexamid	1 gr./litro	Regular	

Continuación del cuadro 33.

Producto	Ingrediente activo	Dosis	Resultados	Fotografía
Amistar 50 WG	Azoxistrobin	0.5 gr./litro	Malo	
Dithane 80 WP	Mancozeb	1 gr./litro	Malo	
Goldazim 50 SC	Carbendazim	0.5 gr./litro	Malo	
		1 gr./litro	Malo	

Fuente: Cedillo Gámez, P.A. 2008

Evaluación de fungicidas para *Fusarium* sp.Cuadro 34. Evaluación de fungicidas para control de *Fusarium* sp.

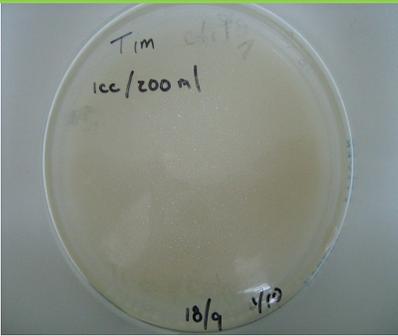
Producto	Ingrediente activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Nativo 300 SC	Tebuconazol	0.3gr./litro	Bueno	
Siganex 600 SC	Pyrimethanil	0.5 cc /litro	Bueno	
Goldazim 50 SC	Carbendazim	0.5 cc/litro	Bueno	
		1 cc/litro	Bueno	

Continuación cuadro 34.

Producto	Ingrediente activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Timorex	<i>Melaleuca alternifolia</i>	5 cc/ litro	Malo	 A petri dish containing a yellowish agar medium. Several small, white, circular fungal colonies are visible on the surface. Handwritten text on the lid includes 'Tim', '1cc/200 ml', 'Fus', and '18/9 24/9'.
Dithane 80 WP	<i>Mancozeb</i>	1 gr./litro	Malo	 A petri dish containing a yellowish agar medium. Several small, white, circular fungal colonies are visible on the surface. Handwritten text on the lid includes 'Dit', '0.2 gr/200 ml', 'Fus', and '9/9 24/9'.

Fuente: Cedillo Gámez, P.A. 2008

Evaluación de fungicidas para *Pythium* sp.Cuadro 35. Evaluación de fungicidas para control de *Pythium* sp.

Producto	Ingrediente Activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Banrot 40 WP	Etridiazol	0.5 gr./litro	Bueno	
Foraxil 72 WP	Metalaxyl	0.1 cc/litro	Bueno	
Siganex 600 SC	Pyrimethanil	0.5 cc /litro	Bueno	
Timorex	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1 cc/ litro	Bueno	

Continuación Cuadro 35.

Producto	Ingrediente Activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Goldazim 50 SC	Carbendazim	0.5 cc/litro	Malo	
		1 cc/litro	Malo	

Fuente: Cedillo Gámez, P.A. 2008

Evaluación de fungicidas para *Phytophthora* sp.Cuadro 36. Evaluación de fungicidas para control de *Phytophthora* sp.

Producto	Ingrediente activo	Dosis	Resultado	Fotografía
Banrot 40 WP	Etridiazol	0.5 gr./litro	Bueno	 A petri dish containing a petri dish with a clear agar surface. Handwritten text on the lid reads "Banrot 0.2gr/200ml" and "29/9 1/10".
Foraxil 72 WP	Metalaxyl	1 cc/litro	Medio	 A petri dish containing a petri dish with a clear agar surface. Handwritten text on the lid reads "Foraxil 0.04cc/200ml" and "29/9 1/10".
Goldazim 50 SC	Carbendazim	0.5 cc/litro	Medio	 A petri dish containing a petri dish with a clear agar surface. Handwritten text on the lid reads "Gold 0.1cc/200ml" and "29/9 1/10".
Previcur 72 SL	Propamocarb	1 cc /litro	Malo	 A petri dish containing a petri dish with a clear agar surface. Handwritten text on the lid reads "Previc 0.4cc/200ml" and "29/9 1/10".

Fuente: Cedillo Gámez, P.A. 2008

3.7.4 Conclusiones y recomendaciones.

- De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que para el control de *Cladosporium* sp., los fungicidas que dieron mejor resultado fueron Siganex 600 SC, Dithane 80 WP y Timorex, para *Botrytis* sp., los que presentaron mejores resultados fueron Bellis 38 WG, Siganex 600 SC, Timorex, Nativo 300 SC y Octave 50 WP, para *Fusarium* sp., los mejores productos fueron Nativo 300 SC, Siganex 600 SC, Goldazim 50 SC en las dos dosis probadas, para *Pythium* sp., los mejores fueron Banrot 40 WP, Foraxil 72 WP, Siganex 600 SC y Timorex, para *Phytophthora* sp., el único que dio buen resultado fue Banrot 40 WP.
- Se observó que el producto Siganex fue el que produjo mejor resultado, ya que controló cuatro de los cinco hongos en los que fue probado, por esto se recomienda su uso para el control de los mismos. El segundo en efectividad fue el Timorex este también dio buen resultado en tres de los cinco hongos en los que fue probado, este último es un producto de origen vegetal.
- Se recomienda que antes de utilizar un nuevo producto se realicen pruebas de fungicidas *in vitro*, de esta manera se tiene una referencia en cuanto a que si el producto, controla el hongo que afecta nuestro cultivo, estas pruebas son rápidas y los reactivos para la preparación del medio son fáciles de conseguir, para una pequeña empresa.

3.8 Bibliografía

1. Bayer Cropscience, SL. 2008a. *Alternaria zinniae* (en línea) Perú. Consultado 23 oct 2011. Disponible en <http://www.bayercropscience.com.pe/web/index.aspx?articulo=519>
2. _____. 2008b. *Phythium* spp. (en línea). España. Consultado 23 oct 2011. Disponible en www.bayercropscience.es/BCSWeb/www/BCS.../ES_Pythium_spp
3. Jardines Mil Flores, GT. 2008. Protocolo de antibiogramas. Amatitlán, Guatemala. 2 p. (Sin publicar).
4. Wehlburg, C. 1969. Patología vegetal, Circular No 86 Dos enfermedades que ocasionan manchas en la hoja de Zinnia, Departamento de Agricultura. División de plantas industriales 1969. Florida, Estados Unidos (en línea) consultado en <http://www.freshfromflorida.com/pi/enpp/pathology/pathcirc/pp86.pdf>
5. Wikipedia.com. 2010a. *Alternaria zinniae* (en línea). España. Consultado 23 ago 2011. Disponible en http://en.wikipedia.org/wiki/Alternaria_zinniae
6. _____. 2010b. Enciclopedia libre *Pythium* sp. (en línea). Consultado 23 ago 2011. Disponible en <http://en.wikipedia.org/wiki/Pythium>
- 7.