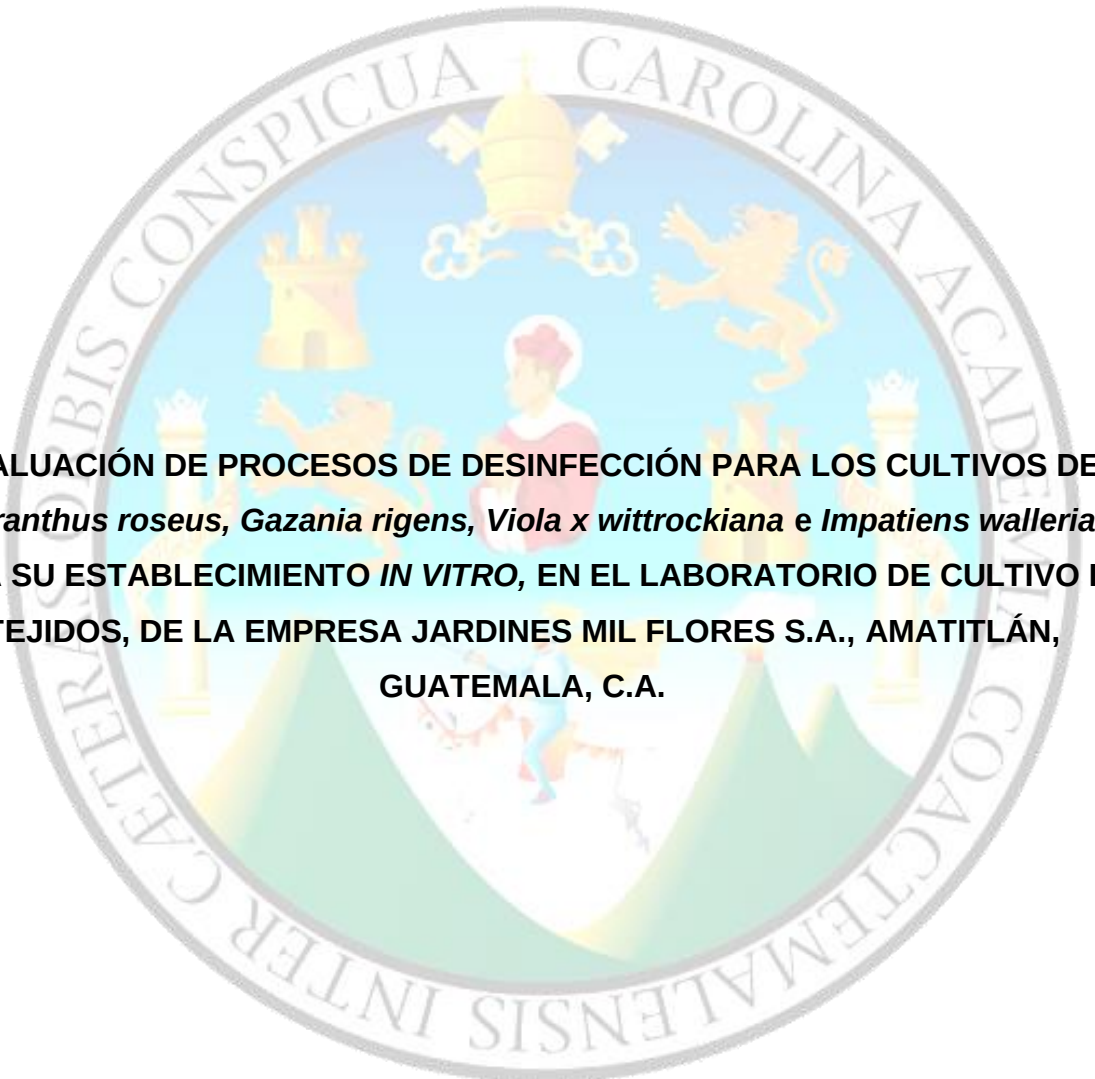


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a blue background. Inside the shield, there is a figure of a person in a red and white robe, possibly a saint or a religious figure, standing on a green base. Above the figure is a golden crown. The shield is surrounded by a blue border containing the Latin text "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERA REBUS CONSPICUA".

EVALUACIÓN DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN PARA LOS CULTIVOS DE
Catharanthus roseus, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana* e *Impatiens walleriana*,
PARA SU ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE
TEJIDOS, DE LA EMPRESA JARDINES MIL FLORES S.A., AMATITLÁN,
GUATEMALA, C.A.

MADELIN MASSIEL MÍNCHÉZ ARIAS

GUATEMALA, OCTUBRE 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES

**“EVALUACIÓN DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN PARA LOS CULTIVOS DE
Catharanthus roseus, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana* e *Impatiens walleriana*,
PARA SU ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE
TEJIDOS, DE LA EMPRESA JARDINES MIL FLORES S.A., AMATITLÁN,
GUATEMALA, C.A.”**

TESIS

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

POR

MADELIN MASSIEL MÍNCHÉZ ARIAS

**En el acto de investidura como
INGENIERA AGRÓNOMA EN
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADA**

GUATEMALA, OCTUBRE 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR EN FUNCIONES

M. A. WALTER RAMIRO MAZARIEGOS BIOLIS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Decano:	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
Vocal I:	Dr. Marvin Roberto Salguero Barahona
Vocal II:	Dr. Gricelda Lily Gutiérrez Álvarez
Vocal III:	Ing. Agr. M.A. Jorge Mario Cabrera Madrid
Vocal IV:	Br. Carmen Aracely García Pirique
Vocal V:	P. Agr. Mynor Fernando Almengor Orenos
Secretario Académico:	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López

GUATEMALA, OCTUBRE 2022

Guatemala, octubre de 2022

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

Distinguidos Miembros:

De acuerdo con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el documento de graduación titulada:

**“EVALUACIÓN DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN PARA LOS CULTIVOS DE
Catharanthus roseus, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana* e *Impatiens walleriana*,
PARA SU ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE
TEJIDOS, DE LA EMPRESA JARDINES MIL FLORES S.A., AMATITLÁN,
GUATEMALA, C.A.”**

Presentando como requisito previo a optar el título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el presente documento llene los requisitos necesarios para su aprobación agradeciendo la atención prestada a la presente.

Atentamente.

“Id y enseñad a todos”



MADELIN MASSIEL MÍNCHÉZ ARIAS

ACTO QUE DEDICO

A

- DIOS:** Por guiarme, darme conocimiento y sabiduría para llegar a cumplir esta meta.
- MI PADRE:** Willman Míncuez, por ser la persona que me inspiró a unirme al ámbito agrícola; te admiro, y agradezco todos tus sacrificios, apoyo, consejos, para que yo pudiera llegar hasta acá. Te amo.
- MI MADRE:** María Luisa Monroy, por ser el pilar de mi vida, mi amiga, consejera; lo eres todo mami, te amo con todo mi corazón. Llegué hasta acá gracias a tu apoyo y amor incondicional.
- MIS HERMANAS:** Shengly, por cuidarme, aconsejarme y brindarme tu apoyo incondicional. Te amo.
- Ahilin, porque tu cariño me ayudo a no desmayar, y llenarme de felicidad todos los días. Te amo mi bebé.
- MIS ABUELITAS:** Herminia Escobar y Andrea Monroy, por todo su cariño, sus oraciones y palabras de aliento.
- MI FAMILIA:** Mis tíos, en especial a Yener y Boanerges, porque su apoyo en mis años de estudio fue incondicional, por sus consejos y cariño. Mis tías, Lolita, Rosalina y Lucy, por animarme y creer en mí siempre. Mis primos Alex, Walfred, Ricky, Arely, los quiero.

MIS AMIGOS DE LA FAUSAC:

Dennisse Licardie, por ser mi amiga y la mejor compañera en mis años de estudio, por apoyarme en momentos difíciles y celebrar cada uno de mis triunfos como tuyos, te quiero muchísimo.

Julio Morales, por apoyarme y compartir siempre de tus conocimientos conmigo, por todas las risas en los pasillos de la facultad, eres un gran amigo, te quiero Julito.

Vicente Martín, por alentarme y creer siempre en mis capacidades, por ser una de las personas que me inspiró a seguir mis sueños y cumplir mis metas. Te quiero mucho Tete.

Daniel Camposeco, por ser un amigo incondicional, ayudarme y guiarme; por todos esos viajes platicando camino a casa, algo de lo que siempre voy a estar agradecida. Lo quiero muchísimo nene.

TESIS QUE DEDICO

A

DIOS

MIS PADRES

MIS HERMANAS

MI FAMILIA

MI SUPERVISOR Y ASESOR

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS -JMF-

JARDINES MIL FLORES S.A. – SYNGENTA FLOWERS-

FACULTAD DE AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios, por darme sabiduría, entendimiento en mis años de estudio y no abandonarme en mis noches de desvelos. Por escucharme en días malos y sus bendiciones constantes a mi familia y a mi vida.

Mis padres, por su apoyo incondicional, esfuerzo y sacrificios para que pudiera lograr esta meta. A ti papi, porque desde el momento en el que te dije que quería ser agrónoma (aun siendo tan pequeña), no hiciste más que alentarme y darme de tus conocimientos, gracias por todo colega. A ti mamita, porque le das sentido a mi vida, por ayudarme a no rendirme en los días que sentía que no podía más, gracias por tus oraciones a lo largo de mi la carrera. No tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí. ESTE LOGRÓ ES SUYO, LOS AMO CON TODO MI CORAZÓN.

Mis hermanas, Shengly y Ahilin, por ser mi inspiración, mis amigas y confidentes en el trayecto de mi vida. Son lo que más quiero en el mundo, su cariño fue mi motor y lo seguirá siendo en mis nuevas metas.

Mi familia en general, mis abuelitas, Herminia Escobar y Andrea Monroy; mis tí@s, Yener, Boanerges, Lolita, Lina, Lucy, por apoyarme en todo el trayecto de mi carrera, y ser partícipes de esta meta.

Mis amigos, en especial a Dennise Licardie, Vicente Martín, Julio Morales y Daniel Camposeco; Por ser mis confidentes, compañeros de trabajo, guías en cada curso y formar parte de mi vida universitaria, mil gracias, los quiero con todo mi corazón. También a mis amigos y compañeros, Sofía Colacho, Mariana Paredes, Nando, Cristian Morales, Bryan Alvarado y Kenneth Madrid.

Mi asesor, el Ing. Agr. Edgar Franco, por su paciencia y todos sus aportes a esta investigación. Por ser un profesor excepcional del que aprendí muchísimo dentro de la Facultad de Agronomía.

Mis líderes en el laboratorio de cultivo de tejidos -JMF-, el Ing. Agr. Gustavo Mendoza, por su orientación, guía y asesoría, por ayudarme a crecer como profesional. Al Ing. Agr. Elmer Roldán, por apoyarme tanto desde que ingrese como epeista, por las pláticas, consejos y risas luego del trabajo, gracias por la amistad forjada. A la MBT. Karla Ponciano, por el aporte, apoyo y consejos, a mi persona y a esta investigación.

Equipo del laboratorio de cultivo de tejidos -JMF-, a Aury Lima, Ingris Poitan, Ana Utuc, Edwin Ovando, Katherine Godoy, Olga Cana, Luz García, Mary Alonzo, Sindy Marroquin, Ana Ramírez, Claudia Muñoz, Silvia Santos, Belsi Hernández, Arely Caballas, Keila Trujillo, Melissa García, Ivanna Pineda y Débora Ortiz, por todas las risas y apoyo en mis evaluaciones de la universidad, no tengo como pagarles todo lo que hicieron por mí, los llevaré siempre en mi corazón.

Departamento de Cultivo -JMF-, en especial a don Saúl Hernández, por darme siempre de su tiempo, sus consejos y por su disposición completa en apoyarme para mi crecimiento profesional.

A los supervisores, Danilo Padilla, Guillermo Zamora, Guillermo Morataya, Óscar Hernández, Roger Aguilar y Xiomara Calderón, por tu paciencia, empatía y apoyo a lo largo de mi EPS.

Laboratorio de fitopatología -JMF-, a Lila Reyes, Claudia Quezada y Delmi Barrios por brindarme de su valioso tiempo y compartirme de sus conocimientos.

Las Vertientes, en especial a Selvin Sandoval y Gilmar Alvizures, por su flexibilidad y apoyo en la coordinación de las actividades para el desarrollo de esta investigación.

Empresa Jardines Mil Flores S.A. -Syngenta Flowers-, por abrirme las puertas y dejarme llevar a cabo mi Ejercicio Profesional Supervisado, agradezco lo aprendido y su apoyo para mi crecimiento como profesional.

Mis profesores a lo largo de la carrera, al Ing. Agr. Edgar Franco, Ing. Agr. Alfredo Suárez, Ing. Agr. Amilcar Sánchez e Ing. Agr. Renato de León, porque sus lecciones me orientaron e hicieron amar la carrera, ustedes fueron realmente una inspiración.

Facultad de Agronomía, por formarme como profesional y brindarme las herramientas necesarias para desempeñarme en las diferentes áreas del ámbito agronómico.

Universidad de San Carlos de Guatemala, mi alma máter, mi casa de estudios, estaré siempre agradecida y orgullosa de ser San Carlita.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO	3
2.1 Marco conceptual	3
2.1.1 Establecimiento de cultivo in vitro de especies vegetales	3
A. Fase 0. Selección y preparación de la planta madre/donante	3
B. Fase 1. Establecimiento o iniciación	4
C. Fase 2. Multiplicación del material	5
D. Fase 3. Enraizamiento y obtención de plantas completas	5
E. Fase 4. Aclimatación de las plantas obtenidas	5
2.1.2 Contaminantes en el cultivo in vitro	6
2.1.3 Eliminación de los contaminantes de los explantes	10
A. Tratamiento a las plantas madres	10
B. Desinfección de los explantes	10
C. Detección de contaminantes latentes	10
D. Desinfectantes para material vegetal	11
a. Hipoclorito de calcio.....	11
b. Hipoclorito de sodio	12
c. Peróxido de hidrógeno.....	12
d. Etanol	13
e. Cloruro de mercurio	13
2.1.4 <i>Catharanthus roseus</i> (L) G. Don.	13
2.1.5 <i>Gazania rigens</i> (L.)	14
2.1.6 <i>Viola x wittrockiana</i>	14
2.1.7 <i>Impatiens walleriana</i> Hook. f.	15
2.2 Marco referencial	16
2.2.1 Lugar donde se realizó la investigación	16
2.2.2 Infraestructura	17

PÁGINA

2.2.3	Equipo	18
2.2.4	Materiales para investigación	18
A.	Cloro comercial magia blanca.....	18
B.	Etanol (70 % v/v)	18
C.	Huwa-San TR 50	19
D.	Rovral WP 50	19
E.	Tetraciclina 500 mg	19
2.2.5	Estudios relacionados al tema de investigación.....	20
A.	An efficient <i>in vitro</i> propagation protocol for <i>Catharanthus roseus</i> (L.)	20
B.	Rapid <i>in vitro</i> propagation, conservation and analysis of genetic stability of <i>Viola pilosa</i>	20
C.	Micropropagation of <i>Viola uliginosa</i> (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis	21
D.	A simple and efficient micropropagation protocol for New Guinea Impatiens (<i>Impatiens hawkeri</i>)	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo general	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4	HIPÓTESIS	23
5	METODOLOGÍA.....	24
5.1	Metodología experimental.....	24
5.1.1	Evaluación de la eficiencia de desinfección de los productos: etanol 70 % v/v, peróxido de hidrógeno (5.40 cm ³ /l) y rovril WP 50 (1 g/l)	24
A.	Descripción de la etapa	24
B.	Descripción de los tratamientos	25
C.	Variable de respuesta.....	25

PÁGINA

5.1.2	Evaluación de la combinación de desinfectantes y concentración de hipoclorito de sodio.....	26
A.	Productos	26
B.	Descripción de tratamientos	26
C.	Variable de respuesta.....	28
D.	Análisis de datos	28
5.1.3	Evaluación del efecto, en el control de la contaminación en cuatro especies ornamentales, del tratamiento que mostró mayor reducción de la contaminación (rovral + tetraciclina + etanol)	28
A.	Descripción de tratamientos	28
B.	Unidad experimental.....	29
C.	Diseño experimental	30
D.	Modelo estadístico-matemático	30
E.	Arreglo experimental.....	32
F.	Variable de respuesta.....	32
G.	Análisis de la información	33
5.2	Manejo del experimento	33
5.2.1	Preparación de bloque madre.....	33
5.2.2	Esterilización de materiales	34
5.2.3	Preparación de soluciones de NaClO 2 %, 2.25 % y 2.50 %	34
5.2.4	Preparación de solución de fungicida rovrál WP 50 (1 g/l y 2 g/l)	34
5.2.5	Preparación de solución de tetraciclina (500 mg/l).....	35
5.2.6	Preparación de solución de peróxido de hidrógeno (5.40 cm ³ /l y 7 cm ³ /l).....	35
5.2.7	Limpieza, desinfección y siembra del material vegetal.....	35
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1	Evaluación de la eficiencia de desinfección de los productos: etanol 70% v/v, peróxido de hidrógeno (5.40 cm ³ /l) y rovrál WP 50 (1 g/l)	37

PÁGINA

6.2	Evaluación de la combinación de desinfectantes y concentración de hipoclorito de sodio.....	40
6.3	Evaluación del efecto, en el control de la contaminación en cuatro especies ornamentales, del tratamiento que mostró mayor reducción de la contaminación (rovral + tetraciclina + etanol)	43
7	CONCLUSIONES	52
8	RECOMENDACIONES.....	53
9	BIBLIOGRAFÍA.....	54
10	ANEXOS	59

ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA

Cuadro 1.	Desinfectantes químicos usados en el cultivo de tejidos vegetales.	11
Cuadro 2.	Productos, concentraciones y tiempos de inmersión evaluados en la primera etapa, para la desinfección y establecimiento <i>in vitro</i>	24
Cuadro 3.	Tratamientos establecidos para evaluar las concentraciones de productos pre-desinfectantes.	25
Cuadro 4.	Productos, concentraciones y tiempos de inmersión evaluados en la segunda etapa, para la desinfección y establecimiento <i>in vitro</i>	26
Cuadro 5.	Tratamientos preliminares para la evaluación de procesos de desinfección.	27
Cuadro 6.	Tratamientos evaluados en la tercera etapa, para la desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de cuatro especies ornamentales.	29
Cuadro 7.	Distribución de las unidades experimentales o repeticiones en la evaluación de proceso de desinfección vs. especies.	32
Cuadro 8.	Porcentaje de explantes no contaminados de las especies vinca (<i>C. roseus</i>), china (<i>I. walleriana</i>) y geranio (<i>P. x hortorum</i>), en la primera etapa de evaluaciones.	37
Cuadro 9.	Porcentaje de explantes no contaminados de geranio (<i>P. x hortorum</i>), vinca (<i>C. roseus</i>), gazania (<i>G. rigens</i>), pensamiento (<i>V. x wittrockiana</i>) y china (<i>I. walleriana</i>), en la segunda etapa de evaluaciones.	41
Cuadro 10.	Porcentaje de explantes no contaminados de las especies vinca (<i>C. roseus</i>), gazania (<i>G. rigens</i>), pensamiento (<i>V. x wittrockiana</i>) y china (<i>I. walleriana</i>), por repetición.	44
Cuadro 11.	Resultado del análisis de varianza (ANDEVA), para la evaluación entre el uso o no de rovril + tetraciclina + etanol, en las especies: vinca, gazania, pensamiento y china.	45
Cuadro 12.	Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey, para el factor proceso de desinfección.	45

PÁGINA

Cuadro 13.	Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para el factor especie.....	46
Cuadro 14.	Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de vinca (<i>Catharanthus roseus</i>).....	46
Cuadro 15.	Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para la especie vinca (<i>Catharanthus roseus</i>).	47
Cuadro 16.	Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de gazania (<i>Gazania rigens</i>).....	47
Cuadro 17.	Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para la especie gazania (<i>Gazania rigens</i>).	48
Cuadro 18.	Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de pensamiento (<i>Viola x wittrockiana</i>).....	48
Cuadro 19.	Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para la especie pensamiento (<i>Viola x wittrockiana</i>).	49
Cuadro 20.	Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de china.	49
Cuadro 21A.	Resultados de los análisis de correlación lineal (coeficiente de pearson), para los porcentajes de NaClO, obtenidos por medio de Infostat® 2018, para los cultivos de geranio, vinca, gazania, pensamiento y china.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.	Características morfológicas del género <i>Aspergillus</i>	7
Figura 2.	A. Esquema del conidioforo de <i>Cladosporium</i> planteada por Schubert et al. (2012). Se observa: ramoconidios (RC), ramoconidios secundarios (RCS), conidios intercalares (CI), y pequeños conidios terminales (CT). B. Fotomicrografía de una preparación en fresco con lactofenol de <i>Cladosporium</i>	8
Figura 3.	Características morfológicas del género <i>Penicillium</i>	8
Figura 4.	Características morfológicas del género <i>Fusarium</i>	9
Figura 5.	Características morfológicas del género <i>Alternaria</i>	9
Figura 6.	Mapa de la ubicación del laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa Jardines Mil Flores, S.A., Amatitlán, Guatemala, Guatemala.	17
Figura 7.	Limpieza y poda de material vegetal antes de su desinfección, para su establecimiento <i>in vitro</i>	36
Figura 8.	Explantes de vinca (<i>C. roseus</i>), con contaminación provocada por hongo y bacteria, en la primera etapa de evaluaciones.	38
Figura 9.	Explantes de china (<i>I. walleriana</i>) contaminados con hongo y bacteria, en la primera etapa de evaluaciones.	39
Figura 10.	Explantes de geranio (<i>P. x hortorum</i>), con contaminados con hongo y bacteria, en la primera etapa de evaluaciones.	39
Figura 11A.	Análisis de interacción gráfico entre los factores de proceso de desinfección y especies.	60
Figura 12A.	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) obtenido de Infostat® 2018 , para comprobación de supuestos de normalidad.	60
Figura 13A.	Comprobación de los supuestos de normalidad a través de Q-Q Plot para los datos de la tercera etapa de evaluaciones, obtenido a través de Infostat® 2018.	61

PÁGINA

Figura 14A.	Histograma con ajuste de distribución normal, para comprobación de supuestos en los datos de la tercera etapa de evaluaciones, obtenido a través de Infostat® 2018.	62
Figura 15A.	Diagrama de dispersión para comprobación del supuesto de independencia o homogeneidad de varianzas, obtenido a través de Infostat® 2018.....	63

ABREVIATURAS

ANDEVA:	Análisis de varianza
ARNm:	Ácido ribonucleico ARN
Ca(ClO) ₂ :	Hipoclorito de calcio
cm ³ :	Centímetros cúbicos
cm:	Centímetros
CO ₂ :	Dióxido de carbono
g:	Gramos
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HgCl ₂ :	Cloruro de mercurio
l:	Litro
min:	Minutos
mm:	Milímetros
mg:	Miligramos
NaClO:	Hipoclorito de sodio
Post-ANDEVA:	Prueba múltiple de medias (Prueba de Tukey)
s:	Segundos
v/v:	Porcentaje volumen-volumen

EVALUACIÓN DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN PARA LOS CULTIVOS DE *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana* e *Impatiens walleriana*, PARA SU ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, DE LA EMPRESA JARDINES MIL FLORES S.A., AMATITLÁN, GUATEMALA, C.A.

EVALUATION OF DIFFERENT DESINFECTION PROTOCOLS FOR THE MICROPROPAGATION OF *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana* e *Impatiens walleriana*, AT EMPRESA JARDINES MIL FLORES S.A., PLANT TISSUE CULTURE LABORATORY, AMATITLÁN, GUATEMALA, C.A.

RESUMEN

La investigación se dividió en tres etapas: en la primera etapa se evaluaron los productos pre-desinfectantes, más NaClO 2 % por 10 min: etanol 70 % por 30 s, peróxido de hidrógeno 5.40 cm³/l por 30 s y rovrál WP 50 1 g/l por 20 min (fungicida), en los cultivos de vinca (*C. roseus*), china (*I. walleriana*) y geranio (*P. x hortorum*) (por disponibilidad de recursos). Obteniendo 100 % de contaminación *in vitro* del testigo relativo (NaClO 2 %/10 min), pero porcentajes muy bajos (no mayores al 30 %) de explantes no contaminados con los otros tratamientos.

Por lo anterior, se decidió aumentar la concentración del peróxido de hidrógeno de 5.40 cm³/l a 7 cm³/l, y de rovrál WP 50 de 1 g/l a 2 g/l, manteniendo tiempos de inmersión. Además, se agregó el producto tetraciclina a 500 mg/l por 10 min, ya que la incidencia por bacteria fue mayor que la de hongo.

Con los resultados se plantearon los tratamientos en la segunda etapa, siendo evaluados procesos de desinfección o combinaciones de desinfectantes, con las concentraciones y tiempos de inmersión de los productos antes mencionados, más concentraciones de NaClO de 2 %, 2.25 % y 2.50 %.

Siendo el proceso de desinfección rovrál + tetraciclina + etanol (más NaClO 2 %/10 min), el que obtuvo en comparación al testigo, mayor reducción de la contaminación *in vitro*, (a excepción de pensamiento (*V. x wittrockiana*)), para los cultivos de vinca (*C. roseus*), gazania (*G. rigens*), china (*I. walleriana*) y geranio (*P. x hortorum*).

Por lo tanto, en la tercera etapa se evaluó el uso de rovrál WP 50 (2 g/l) por 20 min, más tetraciclina (500 mg/l) por 10 min, y etanol (70 % v/v) por 30 s (sumado a la desinfección tradicional de NaClO 2 % por 10 min), comparando el proceso de desinfección convencional de 2 % por 10 min, en las especies antes mencionadas.

En donde, los tratamientos evaluados con rovrál + tetraciclina + etanol, disminuyeron de manera significativa la contaminación *in vitro* para los cultivos de vinca, gazania y pensamiento, en comparación a sus respectivos testigos relativos. Sin embargo, para el cultivo de china, tanto el testigo relativo como el tratamiento con rovrál + tetraciclina + etanol, no lograron realizar la disminución en la contaminación *in vitro*, teniendo tanto presencia de hongo como de bacteria en su totalidad.

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales permite el desarrollo de plantas a partir de pequeños segmentos de tejido vegetal, fue desarrollado por botánicos y fisiólogos vegetales a partir de 1950. Es una herramienta importante que ayuda a la micropropagación de plantas en la agricultura, horticultura, frutales y forestales, libre de patógenos y con alta calidad (Morgan, 2020).

El proceso que implica obtener material vegetal *in vitro* por primera vez, es llamado iniciación, que consiste en llevar una sección de una planta de campo a condiciones asépticas, por medio de desinfección para evitar contaminantes, colocadas en recipientes de vidrio o plástico para su crecimiento (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

Generalmente los desinfectantes usados para obtener material vegetal no contaminado en la iniciación *in vitro* de cultivos son: el hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio, etanol al 70 %, peróxido de hidrógeno, fungicidas, bactericidas y cloruro de mercurio. Cada uno es utilizado por medio de la inmersión del material vegetal en el producto a diferentes concentraciones y tiempos, según sea el caso de la especie que se trabaje (UMSS, 2016).

Para el establecimiento *in vitro* o iniciación de cualquier especie vegetal, superar la etapa de desinfección es necesaria debido a la contaminación provocada por microorganismos endógenos y exógenos que se encuentran en campo. Y dentro del laboratorio de cultivo de tejidos, de la empresa Jardines Mil Flores S.A., la contaminación *in vitro* en la iniciación de las especies *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana* e *Impatiens walleriana*, era recurrente, por lo que la presente investigación consistió en encontrar un proceso de desinfección capaz de reducirlas.

Por lo tanto, se evaluaron procesos de desinfección, realizando la combinación de desinfectantes, como hipoclorito de sodio, etanol 70 %, peróxido de hidrógeno, rovrál WP 50 (fungicida), tetraciclina (antibiótico), en donde sus concentraciones y tiempos de inmersión se determinaron por medio de dos etapas preliminares.

Llegando a la tercera etapa, se demostró que alguno de los tratamientos logró la reducción de contaminación en el establecimiento o iniciación *in vitro* de las especies *Catharathus roseus* (L.) G. Don (vinca), *Gazania rigens* (L.) Gaerth (gazania), *Viola x wittrockiana* (pensamiento) e *Impatiens walleriana* Hook. f (china).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Marco conceptual

2.1.1 Establecimiento de cultivo *in vitro* de especies vegetales

Se distinguen varias etapas por las que debe pasar todo cultivo de tejido vegetal, estas consisten en la selección de la planta y preparación de la misma, deshojado y aplicación de agroquímicos para prevenir posibles contaminantes al menos dos semanas antes de realizar el corte de esquejes, para ser llevados al laboratorio, lugar donde se realiza iniciación *in vitro* del cultivo por medio de desinfección y siembra en tubos de ensayo, cajas de Petri o contenedores con medio de cultivo (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

Los explantes pasan por un proceso de crecimiento para luego realizar micropropagación *in vitro*, por último, son llevados a campo, en donde normalmente pasan por un proceso de aclimatación para convertirse en plantas. A continuación, se describe con mayor amplitud cada etapa (Sharry, Adema, & Abedini, 2020):

A. Fase 0. Selección y preparación de la planta madre/donante

La selección y preparación de la planta donante es importante, debido a que se asegura que el explante que se introduce al laboratorio esté libre de patógenos, crezca *in vitro* y manifieste el fenotipo que se quiere propagar. Por lo que debe tomarse en cuenta que la planta donante tenga características fenotípicas de la especie que se quiera propagar, su estado fisiológico, que debe encontrarse normalmente en estado de crecimiento (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

Esta fase es crucial, porque generalmente es donde se encuentra la principal fuente de contaminación en cultivos *in vitro*. Por esta razón es importante realizar pretratamientos a

las plantas donantes, realizando aplicaciones de fungicidas, bactericidas e insecticidas, con el fin de prevenir una posible contaminación (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

B. Fase 1. Establecimiento o iniciación

En la fase de establecimiento de cultivos *in vitro* se realiza la elección y desinfección del explante para su iniciación a un cultivo axénico (cultivo que se encuentra en un ambiente libre de cualquier otro organismo). En el caso de la selección, para iniciar la propagación *in vitro* normalmente son usados yemas apicales, estacas uninodales, discos de hoja, secciones de raíz y meristemas (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

En la desinfección se debe tomar en cuenta el tamaño del explante, ya que influye en la regeneración de las plantas, mientras más pequeño es el explante es más difícil su regeneración pero es menor el riesgo de contaminación y viceversa (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

Los contaminantes encontrados en el cultivo *in vitro* son hongos filamentosos, bacterias y levaduras, que en campo no son conocidos por provocar daños, sin embargo, *in vitro* suelen convertirse en patógenos. Estos pueden tener una serie de daños directos e indirectos, como la competencia de nutrientes en el medio, colonización en los tejidos o la expulsión de metabolitos tóxicos, lo que provoca la reducción de multiplicación, inhibición de enraizamiento y muerte de la planta (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

Para llevar a cabo la desinfección superficial de explantes se realiza el lavado con agua corriente, aplicación de etanol al 70 %, además de hipoclorito de sodio con gotas de tensoactivos (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Etanol 70 %, y cloruro de mercurio (HgCl₂). Luego

de realizar la desinfección se debe realizar mínimo tres enjuagues sucesivos (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

C. Fase 2. Multiplicación del material

En la fase de multiplicación se realiza el aumento y mantenimiento de material vegetal, para el desarrollo de los explantes es fundamental escoger medios de cultivo, reguladores de crecimiento y dar las condiciones óptimas para el desarrollo de los explantes para que la multiplicación se lleve a cabo de manera exitosa (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

D. Fase 3. Enraizamiento y obtención de plantas completas

El enraizamiento de los explantes puede ser en condiciones *in vitro* y *ex vitro*, haciendo uso de reguladores de crecimiento, o diferentes sustratos (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

E. Fase 4. Aclimatación de las plantas obtenidas

Cuando las plantas obtenidas en el de laboratorio en condiciones *in vitro* son transferidas al exterior, sea al campo o invernadero, éstas suelen ser afectadas ya que las plantas se han mantenido en condiciones específicas, donde se evita el contacto con aire exterior y el flujo de CO₂ e intercambio gaseoso es limitado. Por ello sus estomas al contacto con el ambiente, no responden de la mejor manera al descenso de la humedad relativa (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

Cuando las plantas se transfieren a campo tendrán: cutícula delgada, epidermis discontinua y desorganizada, parénquima ineficiente fotosintéticamente, estomas no funcionales al 100 %, vitrificación (proceso de cristalización y transparencia del explante) raíces delgadas.

Estas plantas pueden morir al ser trasplantadas en sustrato de tierra (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

La aclimatación consiste en un periodo de tiempo donde las plantas se exponen en un descenso paulatino de la humedad, incremento de radiación, temperatura, concentración de CO₂ y flujo de aire, con ello se adaptan al ambiente en el cual crecerán (Sharry, Adema, & Abedini, 2020).

2.1.2 Contaminantes en el cultivo *in vitro*

La contaminación en el cultivo de tejidos vegetales es uno de los mayores problemas que afecta de manera negativa a los explantes. Esta puede ser debido a la manipulación de los operadores en el laboratorio o bien a microorganismos que colonizan la superficie de los tejidos en los explantes (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

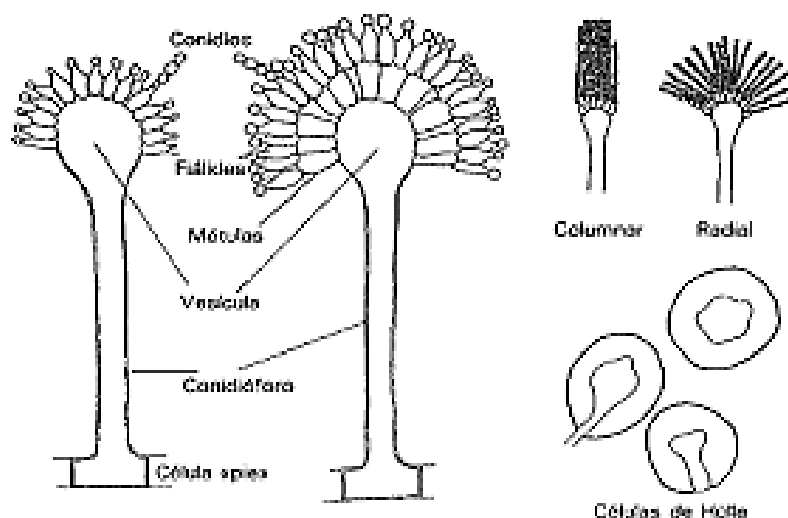
Las principales fuentes de contaminación *in vitro* son, el poco éxito de desinfección de los explantes en la iniciación en cultivos *in vitro*; deficiencias técnicas de asepsia como lo son la incorrecta manipulación de material vegetal o la incompleta esterilización de instrumentos, medios de cultivo, etc.; campana de flujo laminar con problemas de funcionamiento; presencia de insectos (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

La contaminación puede ser por la presencia de hongos, bacterias, levaduras y virus, que pueden provocar el poco desarrollo del explantes y proliferación dentro del laboratorio si no son controlados a tiempo (Perea, 2009).

Las bacterias crecen de manera superficial en el medio de cultivo, tienen diversos colores y texturas, pero la detección y determinación de estos contaminantes solo puede realizarse por medio de procesos serológicos (Perea, 2009). Los géneros de bacterias con mayor incidencia son: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*,

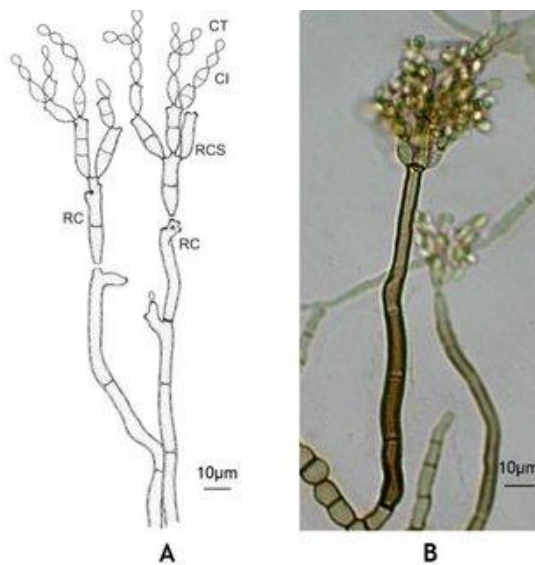
Lactobacillus, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Xantomona* (Agrios, 2005, citado por Suárez, 2020).

Los contaminantes fúngicos son fácilmente detectables de manera visual, su crecimiento forma colonias aisladas, o en el mismo explante, expandiéndose en toda la superficie de recipiente donde se encuentra. Los contaminantes encontrados con mayor frecuencia son: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Perea, 2009), que se muestran en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5, con sus principales características morfológicas respectivamente.



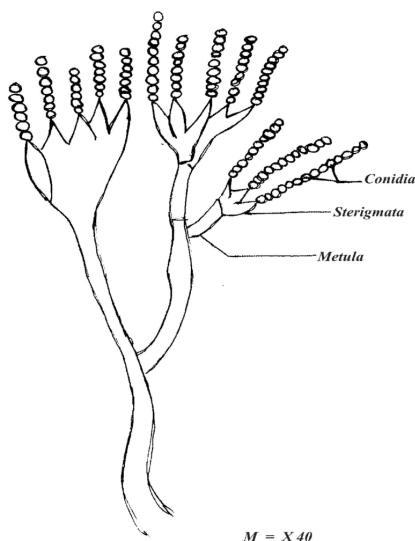
Fuente: (Alcalá, Muñoz, Peláez & Bouza, 2020).

Figura 1. Características morfológicas del género *Aspergillus*.



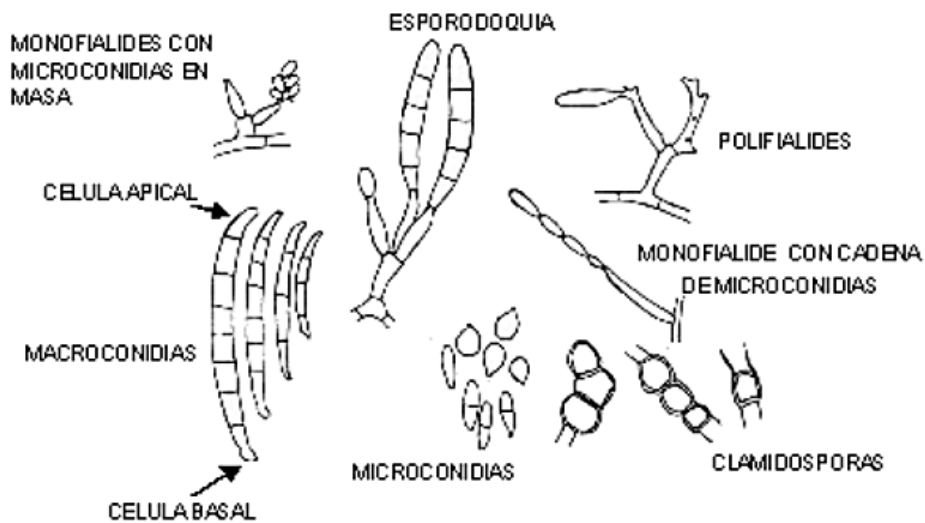
Fuente: (Almaguer, Sánchez, & Rojas, 2014).

Figura 2. A. Esquema del conidioforo de *Cladosporium* planteada por Schubert et al. (2012). Se observa: ramoconidios (RC), ramoconidios secundarios (RCS), conidios intercalares (CI), y pequeños conidios terminales (CT). B. Fotomicrografía de una preparación en fresco con lactofenol de *Cladosporium*.



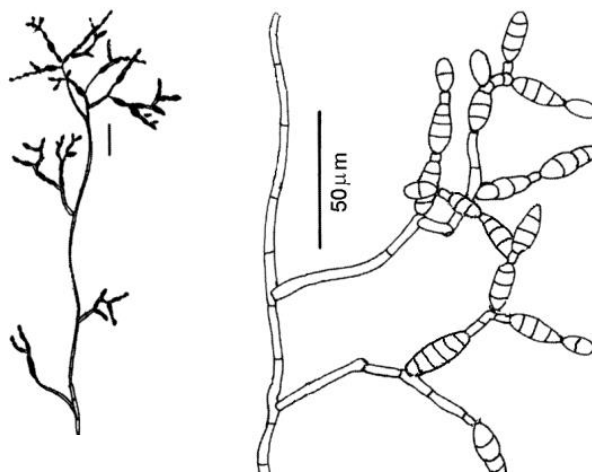
Fuente: (Ounleye & Olaiya, 2015).

Figura 3. Características morfológicas del género *Penicillium*.



Fuente: (Monzón, & Rodríguez, 2013).

Figura 4. Características morfológicas del género *Fusarium*.



Fuente: (Carrillo, 2020).

Figura 5. Características morfológicas del género *Alternaria*.

2.1.3 Eliminación de los contaminantes de los explantes

Eliminar posibles contaminantes de los explantes es de importancia dentro de un laboratorio de cultivo de tejidos, ya que se busca que crezcan y se desarrollen de forma aséptica para la entrega inmediata o la micropropagación y así obtener material vegetal de calidad. Se deben considerar tres puntos para la prevención y tratamiento de los contaminantes (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016):

A. Tratamiento a las plantas madres

Antes de realizar los cortes de los esquejes las plantas madres deben someterse a diferentes aplicaciones para prevenir bacterias y hongos en los tejidos que posteriormente serán explantes (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

B. Desinfección de los explantes

Para iniciar el proceso de desinfección de explantes, normalmente se hace uso de etanol al 70 % v/v por 30 s a 60 s; además de la desinfección superficial, ayuda a eliminar las grasas de las hojas, lo cual permite una mejor penetración del siguiente desinfectante (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

C. Detección de contaminantes latentes

Los explantes deben ser observados y evaluados por la presencia de contaminantes latentes, por un tiempo de al menos seis meses posteriores a la desinfección. Y para las bacterias vitropatógenas a dos o tres meses posteriores a la desinfección (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

D. Desinfectantes para material vegetal

Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio o calcio a diferentes concentraciones, pero también: cloruro de mercurio, alcoholes y otros productos como fungicidas, insecticidas y antibióticos (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

En el cuadro 1, se presentan los desinfectantes más utilizados para el material vegetal, el hipoclorito de sodio es el desinfectante utilizado con mayor frecuencia y con menor frecuencia se ha utilizado el cloruro de mercurio debido a su alta toxicidad, además de la dificultad de removerlo del explante (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

Cuadro 1. Desinfectantes químicos usados en el cultivo de tejidos vegetales.

Desinfectante	Concentración (%)	Tiempo de desinfección (min)
Hipoclorito de calcio	2-10	5-30
Hipoclorito de sodio	0.50-5	5-30
Peróxido de hidrógeno	3-12	5-15
Etanol	70-95	0.50-1
Cloruro de mercurio	0.10-1	2-10

Fuente: (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

a. Hipoclorito de calcio

El hipoclorito de calcio es uno de los compuestos clorados más utilizados, tiene presentación sólida y es usado comúnmente como agente desinfectante, fungicida, bactericida y microbicida, para superficies, material vegetal, tratamiento de agua y hasta para prevenir patógenos en post cosecha. Tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana y remueve microorganismos a baja toxicidad (INS, 2019).

Como se puede observar en el cuadro 1, para fines en cultivo de tejidos es usado a concentraciones del 2 % a 10 % de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, por un tiempo de inmersión del material vegetal desde 5 min a 30 min (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

b. Hipoclorito de sodio

El NaClO es el otro compuesto clorado más usado gracias a su acción bioquímica con el control bacteriológico y microbiológico. Se destaca por ser utilizado para desinfección, esterilización, acción alguicida, decloración, desodorización, tratamiento de aguas, etc (Brinsa, 2018).

En el cuadro 1, se puede observar que su acción desinfectante para cultivo de tejidos es normalmente usado en concentraciones de 0.50 % a 5 % de NaClO , por tiempos de 5 min a 30 min (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

c. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un desinfectante perteneciente al grupo de los oxidantes, también conocido como agua oxigenada o dióxido de hidrógeno. Es un biocida con amplio rango de actividad y eficacia, empleado para la desinfección, esterilización y asepsia. El producto puede encontrarse en concentraciones de 3 % hasta 90 % (Medina & Valencia, 2008).

Para hacer uso del desinfectante peróxido de hidrógeno en cultivo de tejidos vegetales, las concentraciones usadas van del 3 % al 12 % por tiempos de 5 min a 15 min en inmersión del material vegetal (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

d. Etanol

El etanol o alcohol etílico es usado como un desinfectante y antiséptico, su mecanismo de acción produce la precipitación y desnaturalización de proteínas. El alcohol etílico a una concentración del 95 % deshidrata por completo a los microorganismos, por lo tanto, impide la penetración y desinfección en algunos casos (Vignoli, 2015).

Por lo anterior las concentraciones más efectivas se encuentran entre el 60 % y 80 %, pero tiene mayor efectividad la preparación en concentración del 70 %. Además, las concentraciones menores al 50 % no provocan ningún efecto desinfectante. El etanol al 70 % es un excelente bactericida para grampositivas y gramnegativas, puede ser tuberculicida, fungicida y viricida, sin embargo, no actúa en esporas (Vignoli, 2015).

e. Cloruro de mercurio

El cloruro de mercurio es un compuesto usado como desinfectante, fungicida e insecticida, sin embargo, posee alta toxicidad, por lo que es utilizado en bajas dosis y corto tiempo para desinfección de material vegetal in vitro, que pueden ir de 0.10 % a 1 %, por 2 min a 10 min (Aguirre, Baudoin & Leigue, 2016).

2.1.4 *Catharanthus roseus* (L) G. Don.

Catharanthus roseus (L.) G. Don, es una especie ornamental tóxica, de la cual se han extraído químicos importantes para tratamientos de leucemia infantil y cánceres. Pertenece a la familia Apocynaceae y es nativa de Madagascar (CONABIO, 2009).

Su hábito es herbáceo con látex acuosos, posee hojas opuestas, oblongo-elípticas a obovado-elípticas, de 2 cm a 7 cm de longitud y de 1 cm a 4 cm de ancho, ápice ligeramente apiculado, base obtusa a cuneada (CONABIO, 2009).

Sus flores son bisexuales, color púrpura o blanco, con 5 sépalos casi lineares, corola hipocrateriforme, con 5 estambres sobre el tubo de la corola y alternando con sus lóbulos, aflechadas en la base, ovario supero, formando dos carpelos independientes, cada carpelo con una sola cavidad (unilocular), presenta un solo estilo con el estigma ancho y grueso (CONABIO, 2009).

Su inflorescencia se encuentra categorizada como sésil, compuesta por pocas flores que se encuentran en las axilas de las hojas superiores. Por cada flor se producen 2 frutos erectos y secos, de 2 cm a 3 cm de longitud y 2 cm a 3 mm de ancho. Sus semillas son glabras, sin alas (CONABIO, 2009).

2.1.5 *Gazania rigens* (L.)

Comúnmente conocida como gazania, es una especie ornamental que pertenece a la familia Asteraceae. Esta especie, es originaria del sur de África, crece en la costa y bordes de carreteras, desde el sur de Sydney hasta Gosford (PlantNET, 1968).

Es una planta herbácea, perenne, de hojas alternas, siendo verde en el haz y blanca en el envés, simples o provistas de lóbulos, cubierta de pelos blancos y lanosos. Sus flores poseen pétalos que destacan por tener una amplia gama cromática, desde crema, anaranjado, amarillos, rojos y rosáceos. Es casi idéntica a la margarita, pero difiere por sus colores en la corola y en su tamaño (Cantoral, 2014).

2.1.6 *Viola x wittrockiana*

Viola x wittrockiana comúnmente conocida como pensamiento, es una planta ornamental perenne de climas templados. Tiene un ciclo corto y es trabajada como una planta anual o

bienal. Sus semillas tienen un periodo de latencia por lo que posee una baja germinación o incluso plantas anormales (Ollo, 2014).

A comienzos del siglo XIX se realizaron los primeros cruzamientos que llevaron a las variedades modernas de *Viola x wittrockiana*, es una especie que probablemente fue obtenida por el cruzamiento entre *Viola tricolor* y *Viola lutea* (Motos, 2016).

Puede llegar a medir de 15 cm a 25 cm de altura y su flor puede llegar a tener un diámetro de 6 cm, aunque en algunos cultivares los tamaños varían de 3.80 cm a 11.40 cm. Tienen numerosas combinaciones de colores: amarillos, rojos, violeta, azulado, rosas, purpuras, naranjas, bicolores y blancos (Motos, 2016).

2.1.7 *Impatiens walleriana* Hook. f.

Impatiens walleriana Hook. f. es una especie conocida como china, balsamina, gachupina, jazmincillo, con importancia ornamental que se encuentra en estado reproductivo durante casi todo el año (CONABIO, 2009).

La descripción técnica de *Impatiens walleriana* basada en Rzedowski, (1998), es la siguiente: es una planta herbácea anual o perenne que carece de vello, puede medir de 30 cm hasta 70 cm de alto, su tallo puede tornarse de color verdoso, o ligeramente teñido de rosa o rojo, con hojas alternas en espiral con peciolo delgado, de un tamaño de 1 cm a 6 cm de longitud, ápice agudo a acuminado, base cuneada a atenuada, borde crenado-aserrado.

Tiene inflorescencias en forma de racimos en fascículos de (1) 2 (5) flores aglomeradas en la parte superior de la planta, con pedúnculo de 2 cm a 5 cm de longitud, brácteas linear-lanceoladas, pedicelos delgados de 1 cm a 3 cm de longitud.

Sus flores pueden llevar a ser de los colores rojo, anaranjado, morado, rosado, blanco o manchado, con sépalos laterales verdes de forma ovalado-lanceolados de 3 mm a 7 mm de

longitud y 1 mm a 3 mm de ancho. Sépalo impar navicular, petaloide de 8 mm a 15 mm de longitud.

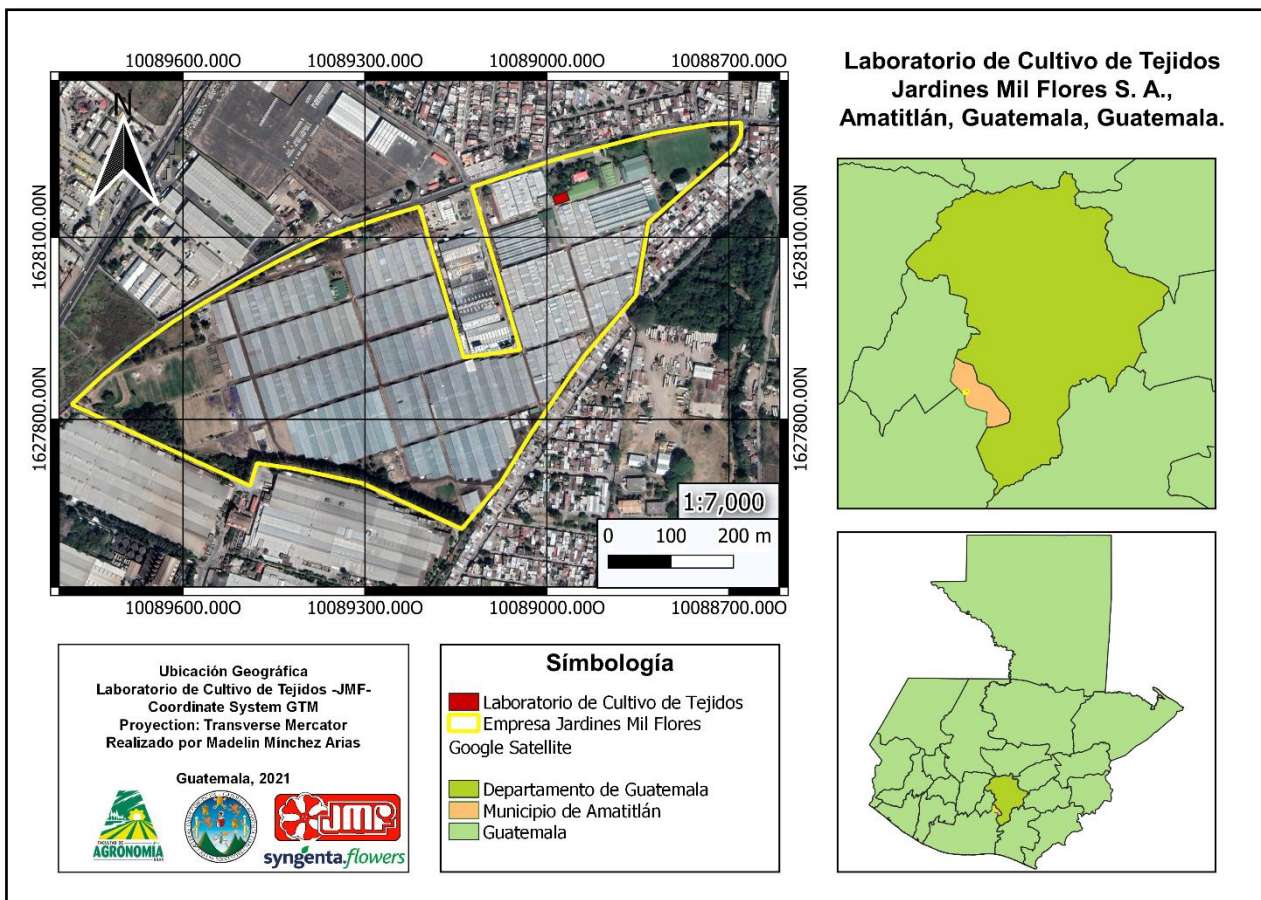
Los pétalos que tienen similar tamaño y forma de 1 cm a 2 cm de longitud y 1.50 cm a 2.50 cm de ancho, con hendidura en el ápice con mancha similar en forma y color al sépalo impar, pétalos laterales unidos basalmente, con filamentos y anteras de 4 mm de longitud en conjunto, ovario ovoide a elipsoide, sin pelos, 1 o 5 estigmas en forma de dientes cortos.

Su fruto es una capsula fusiforme de 1.50 cm a 2 cm de longitud y 0.40 cm a 0.60 cm de ancho sin vellosidad, y semillas piriformes de 1 mm a 1.50 mm de longitud cafés, papiloso-vernicioso o provistas de pelos cortos.

2.2 Marco referencial

2.2.1 Lugar donde se realizó la investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa Jardines Mil Flores S.A., Amatitlán, Guatemala, localizada en el kilómetro 28.5 Carretera al Pacífico, Cantón Ingenio, en las coordenadas, latitud norte 14° 28' 12", longitud oeste 90° 37' 12". A continuación, en la figura 6 se presenta el mapa de la localización del laboratorio de cultivo de tejidos.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 6. Mapa de la ubicación del laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa Jardines Mil Flores, S.A., Amatitlán, Guatemala, Guatemala.

2.2.2 Infraestructura

El laboratorio de cultivo de tejidos cuenta con las áreas de transferencia, preparación de medios, almacén de medios, cuarto para lavado de cristalería, bodega de materiales, cuartos de crecimiento que se encuentran a temperatura promedio de 23 °C.

2.2.3 Equipo

En el laboratorio de cultivo de tejidos cuenta con campanas de flujo laminar en el área de transferencia y, también cuenta con autoclaves, refrigerador, microondas, planta de tratamiento para el agua, potenciómetro, balanza digital y materiales esenciales para propagación como lo son frascos, tubos de ensayo, contenedores, pinzas, bisturís, esterilizadores, gazas, alcohol étílico.

2.2.4 Materiales para investigación

A. Cloro comercial magia blanca

El cloro comercial es comúnmente usado como desinfectante debido a su composición por agua e hipoclorito de sodio, a un aproximado de 4.50 % de NaClO P/V (CORPONOR, 2011).

Mediante la preparación de soluciones se puede llegar a porcentajes de 0.50 %, 1 %, 2 % y demás de hipoclorito de sodio para diferentes usos como es la limpieza y desinfección de superficies, tejido vegetal, tratamiento de agua, postcosecha.

B. Etanol (70 % v/v)

El etanol al 70 % tiene un poder antiséptico superior a otras concentraciones más elevadas. Destruye alrededor del 90 % de bacterias cutáneas, es por ello que se recomienda su uso (Carbajo, 2018).

C. Huwa-San TR 50

Es un desinfectante a base de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con presencia de un ion plata, que actúa como un estabilizador. Este producto es efectivo en bacterias, hongos, levaduras, esporas, virus e incluso micobacterias y tiene la ventaja de ser un desinfectante no residual (Roam Technology, 2020).

El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada es uno de los desinfectantes más utilizados para la desinfección superficial de esquejes. Cuando el compuesto se descompone, libera moléculas de oxígeno, produciendo la oxidación de grupos sulfhidrilos de enzimas bacterianas, provocando la transformación de proteínas perdiendo su función y como consecuencia la muerte celular (Tormo & Rochina, 2020).

D. Rovral WP 50

Es un fungicida protectante usado principalmente para cultivos ornamentales, que pertenece al grupo de las dicarboximidas. Este tiene una gran selectividad, afecta la germinación de esporas, crecimiento de micelio, desarrollo y producción de órganos productores de esporas (FARMAGRO, 2020).

E. Tetraciclina 500 mg

Su mecanismo de acción es bacteriostático, pero en concentraciones altas puede actuar como bactericida, llegando al interior celular por doble mecanismo de difusión pasiva y transporte activo. Tiene amplio espectro, manteniendo efectividad diversa contra los patógenos (Morejón & Cué, 2003).

Inhibe la biosíntesis proteica y la transcripción genética, impide la penetración de ARNm al interior de la subunidad 30 s del ribosoma, provocando un bloqueo para la síntesis de la cadena polipeptídica (Morejón & Cué, 2003).

Ante la presencia de contaminación por bacteria en el establecimiento o iniciación *in vitro* de un cultivo, una manera de disminuir dicha afección es realizando desinfección de material vegetal haciendo uso de tetraciclina a una concentración de 500 mg/l y sumergiendo el material vegetal en la solución durante un tiempo de 10 min.

2.2.5 Estudios relacionados al tema de investigación

A. An efficient *in vitro* propagation protocol for *Catharanthus roseus* (L.)

Se desarrolló un protocolo para la esterilización superficial en explantes de *Catharanthus roseus*, en donde se utilizó el HgCl₂ a concentraciones de 0.05 % y 0.10 %, en tiempos de inmersión entre 1 min a 4 min. Obteniendo el mayor porcentaje de explantes sobrevivientes el tratamiento de 0.10 % de HgCl₂ por 3 min, con el 90 %. Seguido de este tratamiento se encuentra el 0.10 % de HgCl₂ por 4 min, con el 80 % de explantes sobrevivientes (Vandana, Ashwini, Arun & Sumit, 2020).

B. Rapid *in vitro* propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa*

La preparación de explantes de *Viola pilosa* para su desinfección superficial se realizó de la siguiente manera: se lavaron durante 30 min, para limpiar la superficie cerosa se colocaron en un recipiente con una solución de Tween-20 al 5 % por 5 min. Luego se realizó un triple lavado con agua destilada, y se esterilizaron en una solución de bavistina (carbendazim) al 0.10 % (p/v) por 10 min, terminando con un triple lavado con agua destilada esterilizada (Soni & Kaur, 2014).

C. Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis

Se esterilizaron superficialmente peciolas y hojas de *Viola uliginosa* con etanol 70 % por 60 s, posteriormente se colocaron en una solución de cloro comercial ACE al 25 % por 12 min, y se realizó un triple lavado con agua destilada estéril, de 5 min cada lavado (Slazak, Sliwinska, Saluga, et al., 2014).

D. A simple and efficient micropropagation protocol for New Guinea Impatiens (*Impatiens hawkeri*)

Los tratamientos evaluados se realizaron con el producto etanol 70 % por 30 s, NaClO al 1.50 % y 2 % por 10 min, HgCl₂ al 0.10 % por 6 min y cefotaxima en el medio de cultivo a 300 mg/l. Siendo el tratamiento con etanol 70 % por 30 s más NaClO 1.50 % por 10 min, más HgCl₂ 0.10 % por 6 min y el uso de cefotaxima en el medio de cultivo a 300 mg/l, el que redujo en un 75 % la contaminación *in vitro* en explantes de *Impatiens hawkeri* (Samiei, Davoudi, Mirshahi & Karimian, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar procesos de desinfección en las especies: *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola wittrockiana* e *Impatiens walleriana*, para su establecimiento *in vitro*, en el laboratorio de cultivo de tejidos, de la empresa Jardines Mil Flores, S.A., Amatitlán, Guatemala.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la eficiencia de productos pre-desinfectantes: etanol 70 % v/v, peróxido de hidrógeno (5.40 cm³/l), rovrál (1 g/l), en explantes de *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana*, e *Impatiens walleriana*, en la disminución de contaminación *in vitro*.
2. Determinar el tratamiento que con la combinación de desinfectantes y concentración de hipoclorito de sodio reduzca la contaminación *in vitro* en explantes de *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana*, e *Impatiens walleriana*.
3. Comprobar el efecto entre el factor de proceso de desinfección (rovral + tetraciclina+ etanol) y el factor especies: *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana*, e *Impatiens walleriana*, para la reducción de contaminación en su establecimiento *in vitro*.

4 HIPÓTESIS

El uso del producto pre-desinfectante etanol 70 % por 30 s ayudará a reducir la contaminación *in vitro* de los cultivos *Catharathus roseus* (L.) G. Don (vinca), *Gazania rigens* (L.) Gaerth (gazania), *Viola x wittrockiana* (pensamiento) e *Impatiens walleriana* Hook. f (china).

La combinación de desinfectantes: fungicida roval WP 50, más antibiótico tetraciclina, y la concentración de hipoclorito de sodio más alta (2.50 % v/v), reducirá considerablemente la contaminación *in vitro* en explantes de *Catharathus roseus* (L.) G. Don (vinca), *Gazania rigens* (L.) Gaerth (gazania), *Viola x wittrockiana* (pensamiento) e *Impatiens walleriana* Hook. f (china).

Con el tratamiento roval + tetraciclina + etanol, se obtendrán mayores porcentajes de explantes no contaminados de *Catharathus roseus* (L.) G. Don (vinca), *Gazania rigens* (L.) Gaerth (gazania), *Viola x wittrockiana* (pensamiento) e *Impatiens walleriana* Hook. f (china).

5 METODOLOGÍA

5.1 Metodología experimental

5.1.1 Evaluación de la eficiencia de desinfección de los productos: etanol 70 % v/v, peróxido de hidrógeno (5.40 cm³/l) y rovrál WP 50 (1 g/l)

A. Descripción de la etapa

Esta etapa consistió en evaluar los productos: etanol 70 %, peróxido de hidrógeno y rovrál WP 50, realizando la pre-desinfección de explantes de vinca (*Catharanthus roseus*), geranio (*Pelargonium x hortorum*) y china (*Impatiens walleriana*); posteriormente la desinfección convencional con hipoclorito de sodio 2 % por 10 min. Además, junto a los tratamientos (con cada producto pre-desinfectante), se colocó un testigo relativo (NaClO 2 % por 10 min, únicamente). Las dosis y tiempos de inmersión de cada producto evaluado se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Productos, concentraciones y tiempos de inmersión evaluados en la primera etapa, para la desinfección y establecimiento *in vitro*.

Producto	Concentración	Tiempo
Alcohol etílico	70 % (v/v)	30 s
Peróxido de hidrógeno	5.40 cm ³ /l	30 s
Rovral WP 50	1 g/l	20 min
Hipoclorito de sodio	2 % (v/v)	10 min

Fuente: elaboración propia, 2020.

B. Descripción de los tratamientos

En el cuadro 3, puede observarse la distribución de tratamientos, en donde cada uno fue compuesto por un producto pre-desinfectante (etanol 70 %, H₂O₂ o rovrál WP 50) + NaClO al 2 % por 10 min, más un testigo relativo (o solo la inmersión en NaClO 2 %). Siendo un total de cuatro tratamientos evaluados.

Cuadro 3. Tratamientos establecidos para evaluar las concentraciones de productos pre-desinfectantes.

Producto	Código
Etanol 70 % v/v + NaClO 2 %	C1
Peróxido de hidrógeno + NaClO 2 %	C2
Rovral WP 50 + NaClO 2 %	C3
Testigo relativo (NaClO 2 %)	C4

Fuente: elaboración propia, 2020.

C. Variable de respuesta

Se realizó el conteo y descarte de los explantes contaminados con bacteria y/u hongo en un periodo de tiempo de tres semanas.

Cada tratamiento estuvo constituido con un total de 10 explantes, con los cuales se obtuvo el porcentaje de explantes no contaminados. Lo anterior por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de explantes no contaminados} = \frac{\text{número de explantes no contaminados}}{\text{número total de explantes tratamiento}} \times 100$$

5.1.2 Evaluación de la combinación de desinfectantes y concentración de hipoclorito de sodio

A. Productos

Esta segunda etapa consistió en realizar diferentes procesos de desinfección, se evaluaron en total 18 tratamientos, en donde fueron realizadas combinaciones entre productos pre-desinfectantes y posteriormente la desinfección con NaClO 2 % por 10 min.

Las concentraciones de los productos pre-desinfectantes y tiempos de inmersión usados pueden observarse en el cuadro 4, y a partir de los mismos se realizaron combinaciones.

Cuadro 4. Productos, concentraciones y tiempos de inmersión evaluados en la segunda etapa, para la desinfección y establecimiento *in vitro*.

Producto	Concentración	Tiempo
Alcohol etílico	70 % (v/v)	30 s
Peróxido de hidrógeno	7 cm ³ /l	30 s
Rovral WP 50	2 g/l	20 min
Hipoclorito de sodio	2 %, 2.25 % y 2.50 % (v/v)	10 min

Fuente: elaboración propia, 2020.

B. Descripción de tratamientos

Como puede observarse en el cuadro 5, en total se evaluaron 18 tratamientos, en donde se encuentran 6 procesos de desinfección con tres niveles de concentración de hipoclorito de sodio: 2 %, 2.25 % y 2.50 %.

El tratamiento 16, actuó como un testigo relativo, ya que actualmente se utiliza 2 % de hipoclorito de sodio por 10 min para la desinfección del material vegetal.

Los mismos se evaluaron en los cultivos de *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana*, *Impatiens walleriana* y *Pelargonium x hortorum*.

Cuadro 5. Tratamientos preliminares para la evaluación de procesos de desinfección.

Proceso de desinfección	NaClO (%)	Código
Rovral WP 50 + tetraciclina + etanol	2	T1
	2.25	T2
	2.50	T3
Peróxido de hidrógeno + etanol	2	T4
	2.25	T5
	2.50	T6
Peróxido de hidrógeno	2	T7
	2.25	T8
	2.50	T9
Rovral WP 50 + tetraciclina	2	T10
	2.25	T11
	2.50	T12
Etanol	2	T13
	2.25	T14
	2.50	T15
-	2	T16
	2.25	T17
	2.50	T18

Fuente: elaboración propia, 2020.

C. Variable de respuesta

Se realizó el conteo y descarte de los explantes contaminados con bacteria y/u hongo en un periodo de tiempo de tres semanas.

Cada tratamiento estuvo constituido con un total de 5 explantes, con los cuales se obtuvo el porcentaje de explantes no contaminados. Lo anterior por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de explantes no contaminados} = \frac{\text{número de explantes no contaminados}}{\text{número total de explantes por tratamiento}} \times 100$$

D. Análisis de datos

Se realizó análisis de correlación lineal entre las concentraciones de hipoclorito de sodio de 2 %, 2.25 % y 2.50 % y su relación con los porcentajes de explantes no contaminados. Se utilizó para este análisis el programa Infostat® 2018.

5.1.3 Evaluación del efecto, en el control de la contaminación en cuatro especies ornamentales, del tratamiento que mostró mayor reducción de la contaminación (rovral + tetraciclina + etanol)

A. Descripción de tratamientos

Se evaluó el tratamiento que mostró mayor reducción de la contaminación en cuatro especies de ornamentales: vinca, gazania, pensamiento y china, con el uso o no de los productos pre-desinfectantes rovral + tetraciclina + etanol, manteniendo el uso de NaClO 2 % por 10 min, para disminuir la contaminación *in vitro*.

En el cuadro 6, se presentan los 8 tratamientos evaluados. Además, se realizó una comparación tomando en consideración la especie y el uso o no de los agentes pre-desinfectantes.

Cuadro 6. Tratamientos evaluados en la tercera etapa, para la desinfección y establecimiento *in vitro* de cuatro especies ornamentales.

Proceso de desinfección	Especie	Código
Rovral + tetraciclina + etanol	Vinca	M1
	Gazania	M2
	Pensamiento	M3
	China	M4
-	Vinca	M5
	Gazania	M6
	Pensamiento	M7
	China	M8

Fuente: elaboración propia, 2020.

B. Unidad experimental

Cada unidad experimental fue compuesta por 25 explantes contenidos en tubos de ensayo, en las especies de vinca y gazania, con cuatro repeticiones o unidades experimentales, por lo tanto, un total de 100 explantes por tratamiento.

Para el caso de las especies de pensamiento y china cada unidad experimental fue compuesta por 15 explantes, con cuatro repeticiones, en total 60 explantes por tratamiento.

C. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial combinatorio. Con dos factores, siendo el Factor A los procesos de desinfección (con dos niveles: El uso y no uso de rovrál + tetraciclina + etanol) y Factor B las especies (con cuatro niveles: vinca, gazania, pensamiento y china).

Como puede observarse en el cuadro 6, se evaluaron en total ocho tratamientos, de los cuales se realizó cuatro repeticiones de cada uno, siendo entonces 32 unidades experimentales.

D. Modelo estadístico-matemático

El modelo estadístico-matemático para el diseño de bloques completamente al azar en un bifactorial con arreglo combinatorio fue el siguiente:

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

Dónde:

Y_{ijk} : Porcentaje de explantes no contaminados de la ijk - ésima unidad experimental.

μ : Efecto de la media general de explantes no contaminados.

α_i : Efecto del i - ésimo nivel del factor proceso de desinfección.

β_j : Efecto del j - ésimo nivel del factor especie.

$(\alpha\beta)_{ij}$: Efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel del factor proceso de desinfección y el j-ésimo nivel del factor especie.

γ_k : Efecto del k – ésimo bloque.

ε_{ijk} : Error experimental de la ijk - ésima unidad experimental.

Fuente: (López & González, 2016).

Además, se utilizó un diseño de bloques completos al azar, para analizar por separado cada especie estudiada:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Porcentaje de explantes no contaminados en el i - ésimo tratamiento y el j - ésimo bloque.

μ : Efecto de la media general de explantes no contaminados.

τ_i : Efecto del i - ésimo tratamiento.

β_j : Efecto del j - ésimo bloque.

ε_{ij} : Error asociado a la ij - ésima unidad experimental.

Fuente: (López & González, 2016).

E. Arreglo experimental

La distribución de las unidades experimentales se realizó mediante la opción Random de la calculadora científica CASIO fx-83GT PLUS. En el cuadro 7, se encuentra la distribución de tratamientos y repeticiones.

Cuadro 7. Distribución de las unidades experimentales o repeticiones en la evaluación de proceso de desinfección vs. especies.

BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III
M1R2	M2R2	M5R2
M2R1	M4R1	M3R1
M8R3	M7R3	M8R2
M6R2	M3R2	M1R1
M3R3	M5R3	M4R2
M4R2	M6R1	M2R3
M7R1	M8R1	M7R3
M5R1	M1R3	M6R3

Fuente: elaboración propia, 2020.

F. Variable de respuesta

Se realizó el conteo y descarte de los explantes contaminados con bacteria y/u hongo en un periodo de tiempo de tres semanas. Al terminar las tres semanas, se descartaron los últimos explantes contaminados y se recopilaron los datos.

Por lo tanto, se determinó el porcentaje de explantes no contaminados en cada unidad experimental, que contenía 25 explantes o 15 explantes según la especie. Para lo anterior se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de explantes no contaminados} = \frac{\text{número de explantes no contaminados}}{\text{número total de explantes por unidad experimental}} \times 100$$

G. Análisis de la información

Los datos se analizaron por medio del software InfoStat® versión 2018, en donde se obtuvo un análisis de varianza (ANDEVA) para un experimento factorial combinatorio en un diseño de bloques completos al azar, y un diseño de bloques completos al azar para cada especie. En donde en ambos ANDEVA obtuvieron diferencia significativa; por lo que se procedió a realizar Post-ANDEVA o prueba múltiple de medias, con el criterio de Tukey.

5.2 Manejo del experimento

5.2.1 Preparación de bloque madre

Se realizó la solicitud de material vegetal requerido con un periodo de anticipo de dos semanas, tiempo en el cual se preparó a las plantas del bloque madre mediante aplicaciones de agroquímicos (fungicidas, bactericidas, insecticidas). Se realizaron dos rotaciones de tres agroquímicos, cada dos días. Al terminar la rotación se dejó descansar a las plantas por uno o dos días sin aplicaciones previo al corte de los esquejes. Posterior a esto, se realizó el corte de los esquejes y se recibieron los mismos en el laboratorio de cultivo de tejidos para su desinfección y establecimiento.

5.2.2 Esterilización de materiales

Se prepararon los materiales necesarios para realizar el proceso del establecimiento del material vegetal. Por ello, se esterilizó hojas de papel, instrumentos de disección (pinzas y bisturí), frascos para la desinfección y agua desmineralizada. Por lo que todos los materiales anteriores se colocaron en la autoclave a 121 °C por 20 min para eliminar cualquier tipo de contaminante.

5.2.3 Preparación de soluciones de NaClO 2 %, 2.25 % y 2.50 %

Se utilizó cloro comercial para obtener las soluciones, tomando en consideración el porcentaje de hipoclorito de sodio que aportaba. Y a través del mismo, se determinaron las cantidades a utilizar para las concentraciones deseadas de 2 %, 2.25 % y 2.50 % en un litro de agua, por medio de diluciones. En donde se utilizó la ecuación siguiente:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

En dónde:

$C1$: Concentración de NaClO del cloro comercial (aprox. 4.50 %).

$V1$: Volumen de cloro comercial para obtener concentración deseada (incógnita).

$C2$: Concentración de NaClO que se requiere (2 %, 2.25 % y 2.50 %).

$V2$: Volumen (1 l).

5.2.4 Preparación de solución de fungicida rovrál WP 50 (1 g/l y 2 g/l)

Se midió en una probeta un 1/2 l de agua y se colocó en un recipiente. Con una balanza analítica se pesó la cantidad de 1 g o 2 g de rovrál (dependiendo del caso) y se vertió la

cantidad en el recipiente con medio litro de agua, posteriormente se aforo hasta 1 l y se agitó hasta obtener una solución homogénea.

5.2.5 Preparación de solución de tetraciclina (500 mg/l)

Se midió en una probeta 1/2 l de agua y se colocó en un recipiente. Con una balanza analítica se pesó la cantidad de 500 mg de tetraciclina y se vertió la cantidad en el recipiente con 1/2 litro de agua, posteriormente se aforó hasta 1 l y se agitó hasta obtener una solución homogénea.

5.2.6 Preparación de solución de peróxido de hidrógeno (5.40 cm³/l y 7 cm³/l)

Para la preparación de peróxido de hidrógeno a 5.40 cm³/l y 7 cm³/l, se midió los 5.40 cm³ o 7 cm³ con una probeta, y se vertieron en 1/2 l de agua, luego se aforó hasta 1 l de agua, y se agitó hasta obtener una solución homogénea.

5.2.7 Limpieza, desinfección y siembra del material vegetal

Se realizó la poda del material vegetal ingresado al laboratorio, quitando las hojas grandes. Posteriormente, como se observa en la figura 7, se lavó con agua y jabón cada esqueje, para ser trasladados a la campana de flujo laminar para su desinfección.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 7. Limpieza y poda de material vegetal antes de su desinfección, para su establecimiento *in vitro*.

Primero se realizó una pre-desinfección con los productos, concentraciones y tiempos antes mencionados en los cuadros 2, 3, 4, 5 y 6, según fuera el caso. Posteriormente el material vegetal se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2 % (2.25 % o 2.50 % según el caso) por 10 min y un triple lavado con agua desmineralizada estéril, de tres minutos cada lavado. El testigo relativo en todas las etapas solamente se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2 % por 10 min.

Para la siembra del material vegetal, se cortaron con pinzas y bisturí las partes quemadas debido a la desinfección y se colocó un único esqueje en cada tubo de ensayo con medio de cultivo Murashige & Skoog. Los tubos de ensayo fueron sellados con una tapadera, papel parafilm, se trasladaron a un cuarto de crecimiento, se observaron y descartaron los explantes con contaminación.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la eficiencia de desinfección de los productos: etanol 70% v/v, peróxido de hidrógeno (5.40 cm³/l) y rovrál WP 50 (1 g/l)

Para el cultivo de vinca (*Catharanthus roseus*), se observó el 30 % o 3/10 de explantes no contaminados haciendo uso de etanol 70 % v/v por 30 s, y el 20 % o 2/10 de explantes no contaminados utilizando rovrál WP 50 por 20 min, lo que representó una mejora debido a que el tratamiento testigo en donde solo se realizó la desinfección con 2 % de NaClO por 10 min, obtuvo el 100 % de explantes contaminados, incluyendo presencia de un 20 % de contaminación por hongos. A continuación, de referencia se encuentra el cuadro 8. Y en la figura 8, se muestran explantes de vinca (*C. roseus*) con contaminación de hongo y bacteria.

Cuadro 8. Porcentaje de explantes no contaminados de las especies vinca (*C. roseus*), china (*I. walleriana*) y geranio (*P. x hortorum*), en la primera etapa de evaluaciones.

Especie	Producto	Explantes/ tratamiento	Porcentaje de explantes no contaminados (%)	Porcentaje de explantes con bacteria (%)	Porcentaje de explantes con hongo (%)
VINCA (<i>Catharanthus roseus</i>)	Etanol 70 %	10	30	70	0
	Peróxido de hidrógeno	10	0	100	0
	Rovral WP 50	10	20	70	10
	Testigo	10	0	80	20
CHINA (<i>Impatiens walleriana</i>)	Etanol 70 %	10	0	100	100
	Peróxido de hidrógeno	10	0	100	100
	Rovral WP 50	10	0	100	100

Continuación cuadro 8.

	Testigo	10	0	100	100
GERANIO (<i>Pelargonium x hortorum</i>)	Etanol 70 %	10	0	100	0
	Peróxido de hidrógeno	10	10	90	0
	Rovral WP 50	10	0	100	0
	Testigo	10	0	90	10

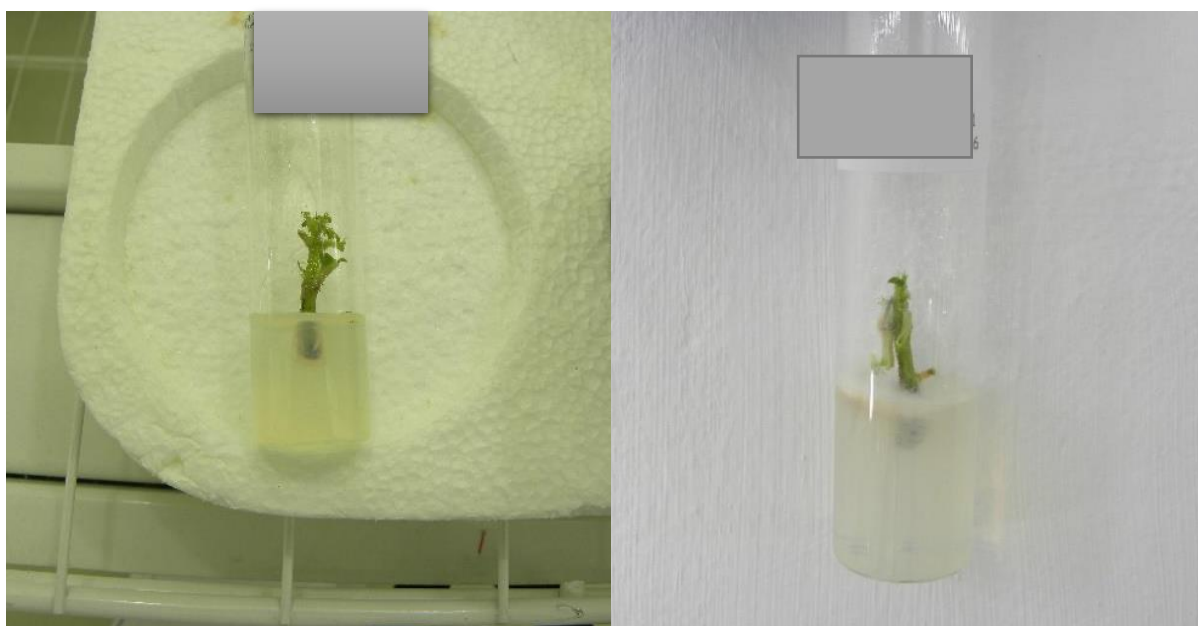


Figura 8. Explantes de vinca (*C. roseus*), con contaminación provocada por hongo y bacteria, en la primera etapa de evaluaciones.

En el cultivo de china (*I. walleriana*), ninguno de los productos a las concentraciones evaluadas impidió la contaminación. A los cinco días después de la iniciación todos los explantes de china se encontraron con la presencia de hongo y bacteria, como puede observarse en la figura 9.

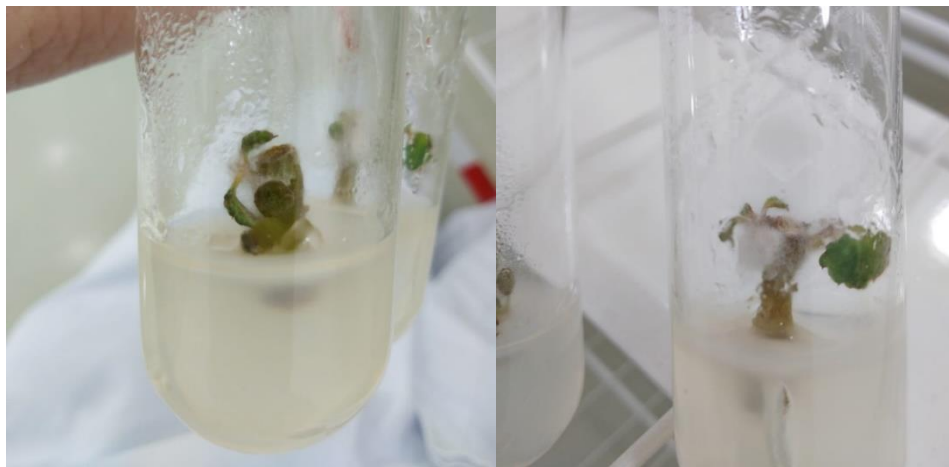


Figura 9. Explantes de china (*I. walleriana*) contaminados con hongo y bacteria, en la primera etapa de evaluaciones.

En el cuadro 8, también se puede observar que para el cultivo de geranio (*P. x hortorum*), con producto pre-desinfectante peróxido de hidrógeno se obtuvo un 10 % o 1/10 explantes no contaminados, lo cual al igual que en el caso de vinca, presenta un aumento al compararlo con el tratamiento testigo con el 100 % de explantes contaminados (figura 10).



Figura 10. Explantes de geranio (*P. x hortorum*), con contaminados con hongo y bacteria, en la primera etapa de evaluaciones.

Los datos obtenidos muestran el aumento de explantes no contaminados con los productos etanol 70 % v/v por 30 s y rovrál WP 50 1 g/l por 20 min en el cultivo de vinca, y para el cultivo de geranio con el producto de peróxido de hidrógeno a 5.40 cm³/l por 30 s. En el caso del cultivo de china, no se encontró producto alguno que disminuya la contaminación a las concentraciones y tiempos evaluados.

Aunque al comparar los porcentajes con el tratamiento testigo, los tratamientos con etanol 70 % v/v, rovrál WP 50 y peróxido de hidrógeno, son mayores, independientemente del cultivo, aún existían pérdidas de 70 %, 80 %, y 90 % de explantes debido a la contaminación. Por lo que se tomó la decisión de aumentar la concentración de rovrál WP 50 de 1 g/l a 2 g/l manteniendo 20 min de inmersión; y la concentración de peróxido de hidrógeno de 5.40 cm³/l a 7 cm³/l por 30 s.

Además, se puede observar en el cuadro 8, que se encontró con mayor frecuencia la presencia del contaminante de bacteria, en comparación con hongos. Con base a este resultado, se buscó alternativas específicas para ayudar a controlar dicho contaminante en la siguiente etapa; se agregó el producto tetraciclina a 500 mg/l por 10 min, el cual es un antibiótico de amplio espectro que en concentraciones altas puede actuar como bactericida (Morejón & Cué, 2003).

6.2 Evaluación de la combinación de desinfectantes y concentración de hipoclorito de sodio

En esta etapa se hicieron diferentes combinaciones de los productos etanol 70 % v/v, rovrál WP 50 2 g/l, tetraciclina 500 mg/l y peróxido de hidrógeno 7 cm³/l, con el fin de aumentar la efectividad de desinfección en los explantes de geranio, vinca, gazania, pensamiento y china. Además de usar tres concentraciones de hipoclorito de sodio al 2 %, 2.25 % y 2.50 %. En el cuadro 9, se encuentran los resultados obtenidos para cada especie.

En el caso de geranio, los tratamientos con mayor reducción de contaminación fueron rovrál + tetraciclina + etanol + 2 % NaClO y rovrál + tetraciclina + etanol + 2.25 % de NaClO con 60 % de explantes no contaminados, en ambos tratamientos; peróxido de hidrógeno + 2 % NaClO y peróxido de hidrógeno + 2.50 % de NaClO con 60 % de explantes no contaminados, en ambos tratamientos; y etanol más 2 % de NaClO con 60 % de explantes no contaminados.

Para vinca, se obtuvo una reducción de contaminación del 100 % con los tratamientos de rovrál + tetraciclina + etanol independientemente de la concentración de NaClO. También, el tratamiento con rovrál + tetraciclina más 2 % de NaClO y etanol 70 % con 2.50 % NaClO.

El tratamiento que mostró el mayor porcentaje de reducción de contaminación para el cultivo de gazania fue el de rovrál + tetraciclina + etanol más 2.50 % de NaClO, el cual tuvo un 40 % de explantes no contaminados.

En el cultivo de pensamiento se obtuvo el 20 % de explantes no contaminados con el tratamiento de etanol 70 % + 2.50 % de NaClO. Y en china, se observó el 20 % de explantes no contaminados con los tratamientos de rovrál + tetraciclina + etanol + 2 % de NaClO, rovrál + tetraciclina + 2.25 % de NaClO y un 17 % con el uso de Etanol 70 % + 2.25 % de NaClO.

Cuadro 9. Porcentaje de explantes no contaminados de geranio (*P. x hortorum*), vinca (*C. roseus*), gazania (*G. rigens*), pensamiento (*V. x wittrockiana*) y china (*I. walleriana*), en la segunda etapa de evaluaciones.

Procesos	Concen- tración NaClO (%)	Porcentaje de explantes no contaminados (%)				
		GERANIO	VINCA	GAZANIA	PENSAMIENTO	CHINA
Rovral + Tetraciclina + etanol	2	60	100	0	0	20
	2.25	60	100	0	0	0

Continuación cuadro 9.

	2.5	40	100	40	0	0
Etanol+ H₂O₂	2	28	67	0	0	0
	2.25	17	80	17	0	0
	2.50	33	3	0	0	0
H₂O₂	2	60	40	0	0	0
	2.25	50	3	0	0	0
	2.50	60	67	17	0	0
Rovral+ tetraciclina	2	0	83	0	0	0
	2.25	17	100	20	0	20
	2.50	20	80	20	0	0
Etanol	2	60	3	0	0	0
	2.25	0	80	0	0	17
	2.50	17	100	0	20	0
Sin proceso	2	17	60	0	0	0
	2.25	43	60	0	0	0
	2.50	17	80	0	0	0

Nota: Rovral WP 50 2 g/l por 20 min; Tetraciclina 500 mg/l por 10 min; Etanol 70 % por 30 s; NaClO % por 10 min a concentraciones de 2 %, 2.25 % y 2.50 %.

En el cultivo de geranio, vinca y china se encontraron coeficientes de correlación muy bajos (cuadro 21A), ya que fueron menores a 0.20. En el caso de pensamiento se obtuvo un coeficiente de 0.30 que también se clasifica como correlación baja. Y para gazania se obtuvo un coeficiente de 0.47 que es considerado como una correlación moderada.

Debido a que los coeficientes de correlación encontrados no estuvieron altamente relacionados, se puede concluir que el aumento de concentración de hipoclorito de sodio no provocó una reducción o incremento en la contaminación *in vitro* en explantes de geranio,

vinca, gazania, pensamiento y china. Por ello, en la tercera etapa se hizo uso de hipoclorito de sodio a una concentración del 2 % únicamente.

En el cuadro 9, al analizar los procesos de desinfección, se puede observar, (a excepción del cultivo de pensamiento), que con el uso de rovrál a 2 g/l por 20 min más tetraciclina 500 mg/l por 10 min más etanol 70 % por 30 s, se observaron los porcentajes más altos de explantes no contaminados.

Por esta razón, se decidió evaluar en la tercera etapa, el uso del rovrál + tetraciclina + etanol como un proceso de desinfección, más el uso de NaClO al 2 % por 10 min, en todas las especies. Comparándolo con el uso único de NaClO al 2 % por 10 min en todas las especies (proceso actual para desinfección en el laboratorio). Y de esta manera, conocer si el proceso de desinfección “rovrál + tetraciclina + etanol” es efectivo en la disminución de contaminación *in vitro*, independientemente de la especie tratada, en comparación al tratamiento que se utiliza en el laboratorio.

6.3 Evaluación del efecto, en el control de la contaminación en cuatro especies ornamentales, del tratamiento que mostró mayor reducción de la contaminación (rovrál + tetraciclina + etanol)

En el cuadro 10, se puede observar los resultados de porcentaje de explantes no contaminados en cada repetición, para las especies: vinca, gazania, pensamiento y china; En esta etapa, no se pudo realizar evaluaciones con el cultivo de geranio (*P. x hortorum*), debido a que se renovó el bloque madre.

Cuadro 10. Porcentaje de explantes no contaminados de las especies vinca (*C. roseus*), gazania (*G. rigens*), pensamiento (*V. x wittrockiana*) y china (*I. walleriana*), por repetición.

No.	PROCESO DE DESINFECCIÓN	ESPECIE	PORCENTAJE DE EXPLANTES LIMPIOS (%)				MEDIA
			I	II	III	IV	
1	Rovral + tetraciclina + etanol	Vinca	50	64	44	60	55
2		Gazania	32	36	52	84	51
3		Pensamiento	14	20	14	20	17
4		China	0	7	7	0	4
5	-	Vinca	40	48	24	28	35
6		Gazania	8	16	0	44	17
7		Pensamiento	0	14	7	0	5
8		China	0	0	7	7	4

En el cuadro 11, se encuentran los resultados del análisis de varianza de la comparación entre los factores: procesos de desinfección / especies. Donde se cumplió el supuesto de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks, que obtuvo un coeficiente mayor a 0.05 (figura 12A). Así mismo, a través de un Q-Q plot e histograma (figuras 13A y 14A), donde los datos se apegan a una distribución normal. Por último, el supuesto de independencia, donde las varianzas muestran homogeneidad (figura 15A).

Ahora bien, en primera instancia, la interacción entre los factores evaluados no es significativa, es decir, que los niveles de procesos de desinfección (uso o no de rovril + tetraciclina + etanol), disminuyen la contaminación *in vitro* independientemente de la especie que se esté tratando. Sin embargo, de forma separada, tanto el factor procesos de desinfección como especie, son significativos, por lo tanto, se realizó una prueba múltiple de medias para cada caso. También puede observarse de forma gráfica en la figura 11A.

Cuadro 11. Resultado del análisis de varianza (ANDEVA), para la evaluación entre el uso o no de rovrál + tetraciclina + etanol, en las especies: vinca, gazania, pensamiento y china.

FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13059.06	10	1305.91	9.56	<0.0001
BLOQUE	791.59	3	263.86	1.93	0.1554
PROCESO DE DESINFECCIÓN	2128.78	1	2128.78	15.59	0.0007
ESPECIE	8918.84	3	2972.95	21.77	<0.0001
PROCESO DE DESINFECCIÓN * ESPECIE	1219.84	3	406.61	2.98	0.0548
ERROR	2868.16	21	136.58		
Total	15927.22	31			

Para el factor proceso de desinfección, el tratamiento con el uso de “rovral + tetraciclina + etanol” (más NaClO 2 % por 10 min), obtuvo significativamente mayores porcentajes de explantes no contaminados, con un promedio de 31.50 % de explantes establecidos independientemente de la especie, que los tratados con solamente con NaClO 2 % por 10 min (cuadro 12).

Cuadro 12. Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey, para el factor proceso de desinfección.

Proceso de desinfección	Medias	N	E.E.		
Rovral + tetraciclina + etanol	31.50	16	2.92	A	B
Sin proceso (NaClO 2 %)	15.19	16	2.92		

Para el factor especies, en el cuadro 13 se muestran los resultados de los porcentajes de explantes no contaminados, que apuntan a que las especies vinca (*C. roseus*) y gazania (*G. rigens*), tienen significativamente menor contaminación *in vitro*, en comparación a las especies de pensamiento (*V. x wittrockiana*) y china (*I. walleriana*).

Cuadro 13. Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para el factor especie.

Proceso de desinfección	Medias	N	E.E.		
Vinca	44.75	8	4.13	A	B
Gazania	34.00	8	4.13		
Pensamiento	11.13	8	4.13		
China	3.50	8	4.13		

Realizando un análisis estadístico individual en cada especie, se demostró en los cuadros 14 y 15, a través de un ANDEVA y Post-ANDEVA, que para el cultivo de vinca (*C. roseus*), existe diferencia estadísticamente significativa con el uso de rovrál + tetraciclina + etanol con el 54.50 % de explantes no contaminados promedio, comparado con 35 % del proceso actual para desinfección.

Cuadro 14. Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de vinca (*Catharanthus roseus*).

FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1246.00	4	311.50	7.22	0.0681
BLOQUE	485.50	3	161.83	3.75	0.1532
PROCESO DE DESINFECCIÓN	760.50	1	760.50	17.62	0.0247
ERROR	129.50	3	43.17		

Continuación cuadro 14.

Total	1375.50	7	
-------	---------	---	--

Cuadro 15. Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para la especie vinca (*Catharanthus roseus*).

Proceso de desinfección	Medias	N	E.E.		
Rovral + tetraciclina + etanol	54.50	4	3.29	A	B
Sin proceso (NaClO 2 %)	35	4	3.29		

Para el cultivo de gazania (*G. rigens*), de igual manera se realizó un ANDEVA y post-ANDEVA, que se encuentran en los cuadros 16 y 17, en donde el uso del proceso de desinfección rovral + tetraciclina + etanol + NaClO 2 %, realizó una reducción significativa con un 51 % de explantes no contaminados promedio, en comparacion con el uso de NaClO 2 % por 10 min con 17 % de explantes no contaminados promedio.

Cuadro 16. Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de gazania (*Gazania rigens*).

FV	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	4760.00	4	1190.00	10.88	0.0393
BLOQUE	2448.00	3	816.00	7.46	0.0665
PROCESO DE DESINFECCIÓN	2312.00	1	2312.00	21.15	0.0193
ERROR	328.00	3	109.33		
Total	5088.00	7			

Cuadro 17. Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para la especie gazania (*Gazania rigens*).

Proceso de desinfección	Medias	N	E.E.		
Rovral + tetraciclina + etanol	51.00	4	5.23	A	B
Sin proceso (NaClO 2%)	17.00	4	5.23		

Al igual que vinca y gazania, el cultivo de pensamiento también mostró una reducción significativa de la contaminación *in vitro* con rovril + tetraciclina + etanol + NaClO 2% por 10 min, de 17 % de explantes no contaminados promedio, comparado con un 5.25 % de explantes no contaminados promedio, realizando la desinfección solamente con NaClO 2 % por min. Se puede observar en el cuadro 18 el análisis de varianza realizado, con resultado significativo y en el cuadro 19 el post-ANDEVA.

Cuadro 18. Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de pensamiento (*Viola x wittrockiana*).

FV	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	382.50	4	95.63	4.46	0.1249
BLOQUE	106.38	3	35.46	1.65	0.3450
PROCESO DE DESINFECCIÓN	276.13	1	276.13	12.87	0.0371
ERROR	64.38	3	21.46		
Total	446.88	7			

Cuadro 19. Prueba Múltiple de Medias o Post-ANDEVA, utilizando prueba de Tukey para la especie pensamiento (*Viola x wittrockiana*).

Proceso de desinfección	Medias	N	E.E.		
Rovral + tetraciclina + etanol	17.00	4	2.32	A	B
Sin proceso (NaClO 2 %)	5.25	4	2.32		

Finalmente, el cultivo de china fue el único que no mostró reducción en la contaminación con los procesos evaluados. Se puede observar en el cuadro 10, que las medias de los porcentajes de explantes no contaminados para el cultivo de china son del 4 %. Y realizando un análisis de varianza del mismo, no se encontraron diferencias significativas, como se puede observar en el cuadro 20.

Cuadro 20. Análisis de varianza (ANDEVA) para el cultivo de china.

FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	49.00	4	12.25	0.75	0.6187
BLOQUE	49.00	3	16.33	1.00	0.5000
PROCESO DE DESINFECCIÓN	0.00	1	0.00	0.00	>0.9999
ERROR	49.00	3	16.33		
Total	98.00	7			

A excepción del cultivo de china, todas las especies evaluadas disminuyeron significativamente la contaminación *in vitro* con el proceso de desinfección rovrál WP 50 2 g/l por 20 min, más tetraciclina 500 mg/l por 10 min y etanol 70 % por 30 s. Por esta razón, se deben evaluar otros procesos de desinfección; como los encontrados en la segunda etapa

de evaluaciones (cuadro 9), en donde se tuvo un 20 % de explantes no contaminados con rovrál 2 g/l por 20 min y tetraciclina 500 mg/l por 10 min; Y 17 % de explantes no contaminados con etanol 70 % por 30 s.

Sin embargo, aunque en los procesos de desinfección de la segunda etapa de evaluaciones para el cultivo de china, hay porcentajes de explantes no contaminados, estos no son altos (20 % y 17 %). Por lo que se debe buscar otros métodos de desinfección, inclinándose en primer lugar, con la identificación de los contaminantes, para seleccionar desinfectantes específicos.

Por otro lado, se pueden seguir explorando procesos de desinfección que mostraron porcentajes altos en la segunda etapa (cuadro 9); como en geranio el uso de peróxido de hidrógeno con 60 %, 50 % y 60 % de explantes no contaminados; en vinca el uso de rovrál + tetraciclina con 83 %, 100 % y 80 % de explantes no contaminados; en gazania el uso de rovrál + tetraciclina con 20 % y 20 % de explantes no contaminados; pensamiento con etanol 70 % con un 20 % de explantes no contaminados; y china con los tratamientos antes mencionados.

Además, Vandana, et. al (2020), señalan que para el cultivo de vinca (*Catharanthus roseus*), realizar la desinfección con 1 % de Bavistin y 1 % de Blitox por 10 min (fungicidas), y 0.10 % de HgCl_2 por 3 min se obtuvieron hasta un 90 % de explantes no contaminados. Sin embargo, el HgCl_2 es un compuesto peligroso, siendo mortal en caso de contacto con la piel y su ingestión, causando quemaduras graves y lesiones oculares, entre otros. Por lo que lo encontrado en el presente estudio, puede servir como alternativa, con un 54.50 % de explantes no contaminados usando rovrál + tetraciclina + etanol más hipoclorito de sodio 2 % por 10 min.

Para el caso del cultivo de pensamiento (*Viola x wittrockiana*), existen otras especies de la familia Violaceae en las que se presentaron métodos de desinfección, como lo es *Viola uliginosa*, en el estudio realizado por Slazak, et. al (2014), esterilizando explantes con 70 % de etanol por 60 s, cloro comercial a 1:4 por 12 min y tres lavados con agua desmineralizada

estéril de 5 min cada uno. Sin embargo, no se especifica en el estudio el porcentaje de explantes no contaminados obtenidos.

Así mismo en el caso de *Viola pilosa*, en un estudio realizado por Soni & Kaur, (2014), quienes lavaron los explantes por 30 min, posteriormente añadieron en una solución de tween 20 % al 5 % por 5 min, tres lavados con agua desmineralizada estéril, bavistin (carbendazim) que es un fungicida al 0.10 % por 10 min y un triple lavado con agua desmineralizada estéril. De igual manera no se especifican los explantes no contaminados obtenidos, pero se pueden tomar de referencia para posibles estudios en un futuro, ya que son protocolos de desinfección que ya han sido utilizados.

La especie de china (*Impatiens walleriana*), fue la única especie que no mostró mejoras significativas en el presente estudio, que puede compararse con el estudio presentado por Samiei, L., Davoudi M., Mirshahi, H., & Z. Karimian., (2019), donde se evaluaron diferentes tipos de protocolos de micropropagación para la especie New Guinea (*Impatiens hawkeri*), en donde se obtuvo un 100 % de contaminación por hongo y bacteria habiendo utilizado Etanol 70 % por 30 s, NaClO al 1.50 % y 2 % por 10 min.

En el estudio anterior, también se realizaron otros tratamientos, como el uso de etanol e NaClO a 1.50 % y 2 %, pero agregando HgCl₂ a 0.10 % de 6 min obteniendo en este caso un 97.50 % de explantes contaminados. Y siendo el único tratamiento con un porcentaje alto de explantes no contaminados utilizando etanol al 70 % por 30 s, NaClO 1.50 % por 10 min, HgCl₂ a 0.10 % de 6 min y realizando el uso de cefotaxime a 300 mg/l en el medio de cultivo, con un total de 75 % de explantes no contaminados.

Por lo que el uso de cefotaxime a 300 mg/l en el medio de cultivo, podría ayudar a establecer el cultivo de *Impatiens walleriana* al igual que *Impatiens hawkeri*, eliminando contaminantes como *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium* (Agrios, 2005, citado por Suárez, 2020), *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, entre otros (Perea, 2009), los cuales son encontrados comúnmente en cultivo de tejidos.

7 CONCLUSIONES

1. El etanol 70 % y rovrál WP 50 1 g/l muestran eficiencia de entre 20 % y 30 % en la reducción de la contaminación en el proceso de iniciación *in vitro* de explantes de vinca (*Catharanthus roseus*). El peróxido de hidrógeno a 5.40 cm³/l disminuye hasta el 10 % la contaminación en el proceso de iniciación *in vitro* en explantes de geranio (*Pelargonium x hortorum*). Y el etanol 70 %, rovrál WP 50 1 g/l y peróxido de hidrógeno 5.40 cm³/l, no muestran efecto alguno en la reducción de la contaminación en el proceso de iniciación en explantes de china (*Impatiens walleriana*).
2. Al utilizar, en el proceso de desinfección de explantes en secuencia, los productos rovrál + tetraciclina + etanol + NaClO 2 %, se disminuye la contaminación de explantes de *C. roseus* 100 %, *I. walleriana* 20 % y *P. x hortorum* 50 %. Cuando se utiliza NaClO al 2.50 % se reduce la contaminación de explantes en *G. rigens* 40 %. La utilización de las concentraciones de hipoclorito de sodio al 2 %, 2.25 % y 2.50 % tienen efectos similares en la reducción de la contaminación en explantes.
3. No existe relación entre los factores procesos de desinfección (rovrál + tetraciclina + etanol) y especie (*C. roseus*, *G. rigens*, *V. x wittrockiana*, *I. walleriana*) en la disminución de la contaminación de explantes en el proceso del establecimiento de las especies *in vitro*. Sin embargo, en el factor procesos de desinfección, en todas las especies fue efectivo el uso de rovrál + tetraciclina + etanol + NaClO 2 %, a excepción de la especie de china (*Impatiens walleriana*).

8 RECOMENDACIONES

1. Evaluar el proceso de desinfección de rovrál WP 50 (2 g/l) por 20 min y tetraciclina 500 mg/l por 10 min, en los cultivos de geranio, vinca, gazania y china, ya que se obtuvo porcentajes explantes no contaminados, en mayor cantidad comparado con el testigo, en la segunda etapa (cuadro 9).
2. Evaluar el proceso de desinfección de peróxido de hidrógeno a 7 cm³/l para el cultivo de geranio, ya que obtuvo los porcentajes altos de explantes no contaminados en la segunda etapa de evaluaciones (cuadro 9).
3. Evaluar el proceso de desinfección de etanol 70 % v/v por 30 s para el cultivo de pensamiento, ya que en la segunda etapa (cuadro 9), se presentó un 20 % de explantes no contaminados.
4. Para evaluaciones futuras, determinar si el proceso de desinfección rovrál + tetraciclina + etanol también puede realizar una reducción de contaminación para el cultivo de geranio a través de un análisis estadístico.
5. Para la desinfección y establecimiento *in vitro* de las especies: vinca, gazania y pensamiento, hacer uso de rovrál WP 50 a 2 g/l en inmersión de 20 min, tetraciclina a 500 mg/l en inmersión por 10 min, etanol 70 % v/v por 30 s, e hipoclorito de sodio al 2 % por 10 min, para obtener al menos un 31.50 % de explantes no contaminados en promedio.
6. Identificar los contaminantes que afectan al cultivo de china (*Impatiens walleriana*), para encontrar un agente desinfectante capaz de eliminarlos.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre G., Baudoin, J., & Leigue, L. (2016). *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos* [Archivo PDF]. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>
2. Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T., & Bouza, E. (2020). *Aspergillus y aspergilosis* [Archivo PDF]. España. https://www.adiveter.com/ftp_public/articulo782.pdf
3. Almaguer, M., Sánchez, K., & Rojas, T. (2014). El género *Cladosporium* en la atmosfera del Occidente de Cuba: pasado, presente y futuro. *Revista cubana de ciencias biológicas*, 3 (8) 17. https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-A-Cladosporium-conidiophore-drawn-by-Schubert-et-al-2012-ramoconidia-RC_fig4_282130206
4. Brinsa. (2018). *Ficha técnica NaClO Hipoclorito de sodio* [Archivo PDF]. Colombia. <http://www.brinsaquimica.com.co/wp-content/uploads/2017/10/FT-Hipoclorito-de-Sodio.pdf>
5. Cantoral, L. (2014). *Producción de gazanias (Gazania x hybrida, Gazania splendens) en un sistema hidropónico de raíz flotante*. [Tesis de Ing. Agr. y Amb., Universidad autónoma Agraria]. México. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4397/63156%20CANTORAL%20CALVO%2C%20LEONARDO%20DANIEL%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
6. Carbajo, L. (2018). Tipos de antisépticos, presentaciones y normas de uso. *Revista Medicina Intensiva*, 43(S1), 7-12. <https://medintensiva.org/es-tipos-antisepticos-presentaciones-normas-uso-articulo-S0210569118302754>



7. Carrillo, L. (2020). *Los hongos de los alimentos y forrajes* [Archivo PDF]. <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/7alternaria.pdf>

8. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. (2009a). *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. México. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/apocynaceae/catharanthus-roseus/fichas/ficha.htm#:~:text=Categ%C3%ADas%20taxon%C3%B3micas%20superiores,%3A%20Asteridae%3B%20Orden%3A%20Gentianales>.

9. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. (2009b). *Impatiens walleriana* Hook. f. México. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/balsaminaceae/impatiens-walleriana/fichas/ficha.htm>

10. Corporación autónoma regional de la frontera nororiental. (2011). *Hoja de seguridad de desinfectante de uso doméstico cloro*. Colombia. https://www.javeriana.edu.co/documents/4486808/5015300/CLOROX+%28Hipoclorito+de+Sodio%29+_THE+CLOROX+COMPANY.pdf/4ef7970d-d03b-4f7f-a240-596db90fd98c?version=1.0

11. FARMAGRO. (2020). *Ficha técnica de rovrál 50 pm* [Archivo PDF] Ecuador. http://www.farmagro.com.pe/media_farmagro/uploads/ficha_tecnica/rovrál_-ficha_tecnica_Oy73eCn.pdf

12. Instituto nacional de salud. (2019). *Procedimiento de limpieza y desinfección de áreas y superficies en puntos de entrada para la enfermedad por virus del ébola (EVE)*. Ministerio de Salud. Colombia. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/VSP/Procedimiento%20No%2013.pdf>

13. López, E., & González, B. (2016). *Diseño y análisis de experimentos: fundamentos y aplicaciones en agronomía* [Archivo PDF]. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. http://cete.fausac.gt/wp-content/uploads/2020/11/Diseno_y_Analisis_de_Experimentos_2016a.pdf



14. Medina, L., & Valencia, L. (2008). *Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrógeno, empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios*. [Tesis de Licenciatura Microbiología industrial, Pontificia Universidad Javeriana]. Colombia. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8621>
15. Monzón, A., & Rodríguez, J. (2013). *Infecciones causadas por el género Fusarium* [ArchivoPDF]. <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>
16. Morejón, M., Salup, R., & Cué, M. (2003). Actualización en tetraciclinas. *Revista Cubana Farmacia*, 37(3). Cuba. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000300008
17. Morgan, W. (2020). *Cultivo de tejido vegetal* [Archivo PDF]. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/CultivoTejidos.pdf>
18. Motos, J. (2016). *Efecto de la fertilización y tecnología aplicada sobre la productividad y calidad de Viola x wittrockiana*. [Tesis de Doctorado, Universidade da Coruña]. España. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/15574>
19. Ogunleye, A., & Olaiya, G. (2015). Isolation, identification and mycotoxin production of some microflora of dried stockfish (*Gadus morhua*). *Academic Journal of science*, 04(01):345-363. https://www.researchgate.net/publication/304253786_ISOLATION_IDENTIFICATION_AND_MYCOTOXIN_PRODUCTION_OF_SOME_MYCOFLORA_OF_DRIED_STOCKFISH_GADUS_MORHUA
20. Ollo, M. (2014). *Evaluación de distintos compost (industrial y doméstico) como ingrediente de sustrato y la acción de lavado sobre los mismos en pensamiento*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Pública de Navarra]. España. <http://academica-e.unavarra.es/xmlui/bitstream/handle/2454/10407/629128.pdf?sequence=1&isAllowed=y>



21. Perea, M. (2009). *Cultivos de tejidos vegetales in vitro*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf?fbclid=IwAR2xLhdtU-7yKztpAvuWQjdZYh-ltzpcYT6PnzpAErkw__ZozfqclxwYy-Y
22. PlantNET. (1968). *Gazania rigens* (L.) Gaerth. <https://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=sp&name=Gazania~rigens>
23. Roam Technology NV. (2021). *Huwa-San TR 50*. <https://www.roamtechnology.com/es/products/huwa-san/>
24. Samiei, L., Davoudi, M., Mirshahi, H., & Karimian, Z. (2018). A simple and efficient micropropagation protocol for New Guinea Impatiens (*Impatiens hawkeri*). *Environmental Biology*, 39(4): 454-458. <http://doi.org/10.22438/jeb/39/4/MRN-690>
25. Slazak, B., Sliwinska, E., Saluga, M. et al. (2014). Micropropagation of *Viola utiginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120(2015):179-190. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0592-3>
26. Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* [Archivo PDF]. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. Argentina. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__pdf-PDFA.pdf?sequence=1
27. Soni, M., & Kaur, R. (2014). Rapid in vitro propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(1):95-101. https://www.researchgate.net/publication/260272446_Rapid_in_vitro_propagation_conservation_and_analysis_of_genetic_stability_of_Viola_pilosa



28. Suárez, I. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrícolas, Biotecnología Vegetal. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/2553/Libro%20Cultivo%20de%20Tejidos%20Vegetales%20Edici%C3%B3n%2003-03-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. Tormo, V., & Rochina, I. (2012). *Antisépticos. Fundamentos de uso en la práctica clínica*. [Archivo PDF]. España. https://www.uv.es/curafisiologica/documentos/publicaciones/muestra_web_antisepticos.pdf
30. Vandana, S., Ashwini, K., Arun, K & Sumit, K. (2020). An efficient in vitro propagation protocol for *Catharanthus roseus* (L). *Research journal of Biotechnology*, 15(1). https://www.researchgate.net/publication/338710747_An_efficient_in_vitro_propagation_protocol_for_Catharanthus_roseus_L
31. Vignoli, R. (2015). *Esterilización, desinfección y antisepsia* [Archivo PDF]. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/esterilizacionydesinfeccion.pdf>



10 ANEXOS

Cuadro 21A. Resultados de los análisis de correlación lineal (coeficiente de pearson), para los porcentajes de NaClO, obtenidos por medio de Infostat® 2018, para los cultivos de geranio, vinca, gazania, pensamiento y china.

GERANIO		
<i>Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades</i>		
	% NaClO GERANIO	
% NaClO	1.00	0.62
GERANIO	-0.12	1.00
VINCA		
<i>Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades</i>		
	% NaClO VINCA	
% NaClO	1.00	0.53
VINCA	0.16	1.00
GAZANIA		
<i>Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades</i>		
	% NaClO GAZANIA	
% NaClO	1.00	0.05
GAZANIA	0.47	1.00
PENSAMIENTO		
<i>Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades</i>		
	% NaClO PENSAMIENTO	
% NaClO	1.00	0.23
PENSAMIENTO	0.30	1.00
CHINA		
<i>Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades</i>		
	% NaClO CHINA	
% NaClO	1.00	0.45
CHINA	-0.19	1.00

Fuente: elaboración propia, 2021.

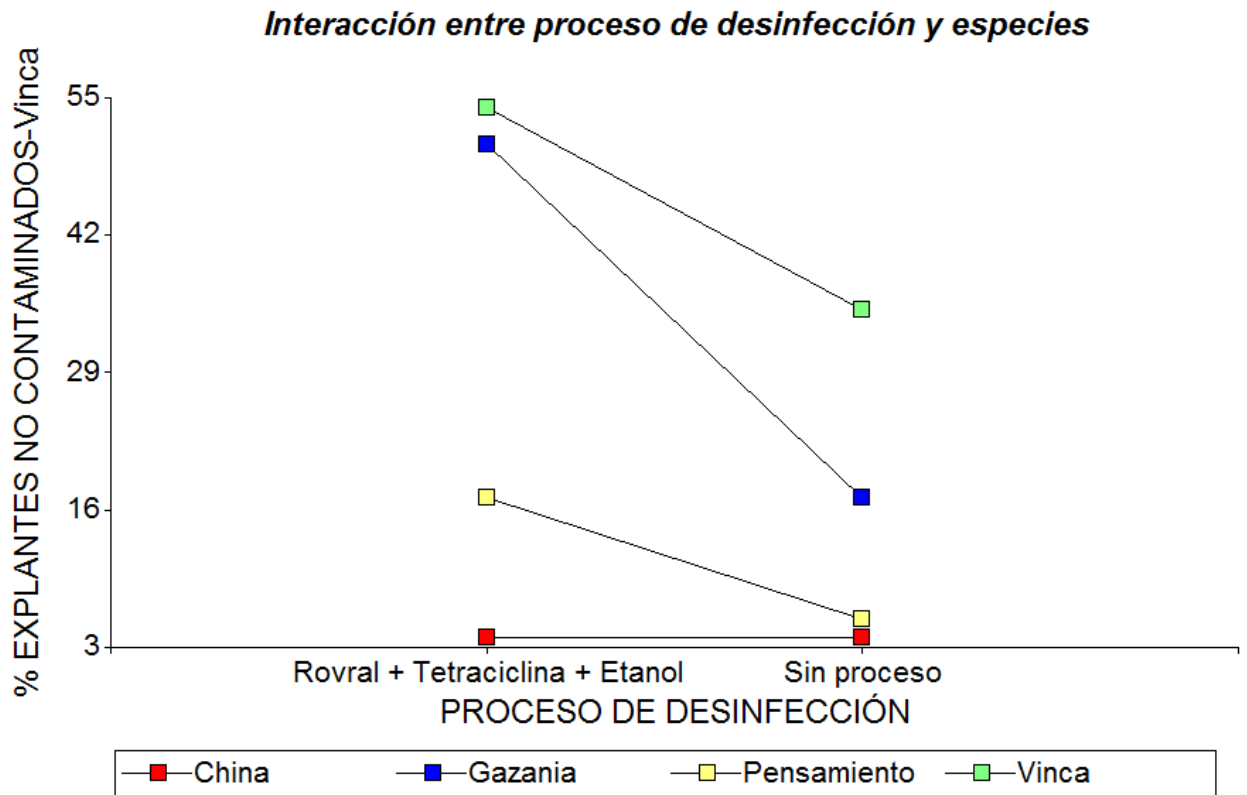


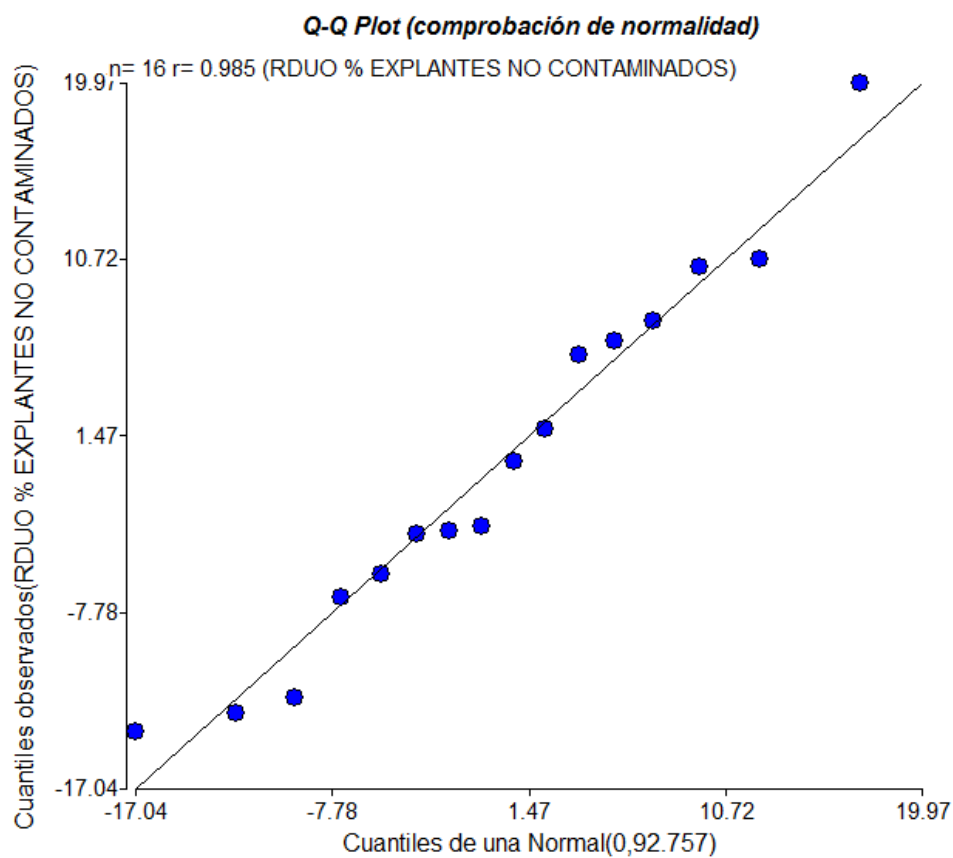
Figura 11A. Análisis de interacción grafico entre los factores de proceso de desinfección y especies.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO % EXPLANTES NO CONTAM..	32	0.00	9.62	0.96	0.6171

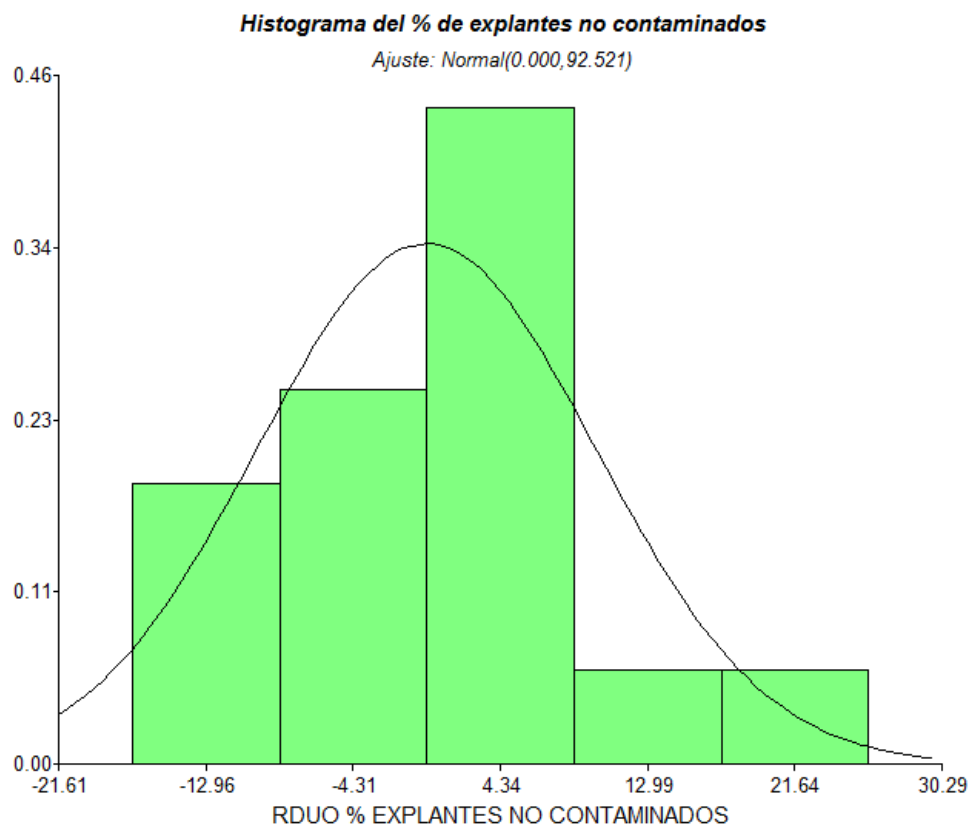
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 12A. Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) obtenido de Infostat® 2018 , para comprobación de supuestos de normalidad.



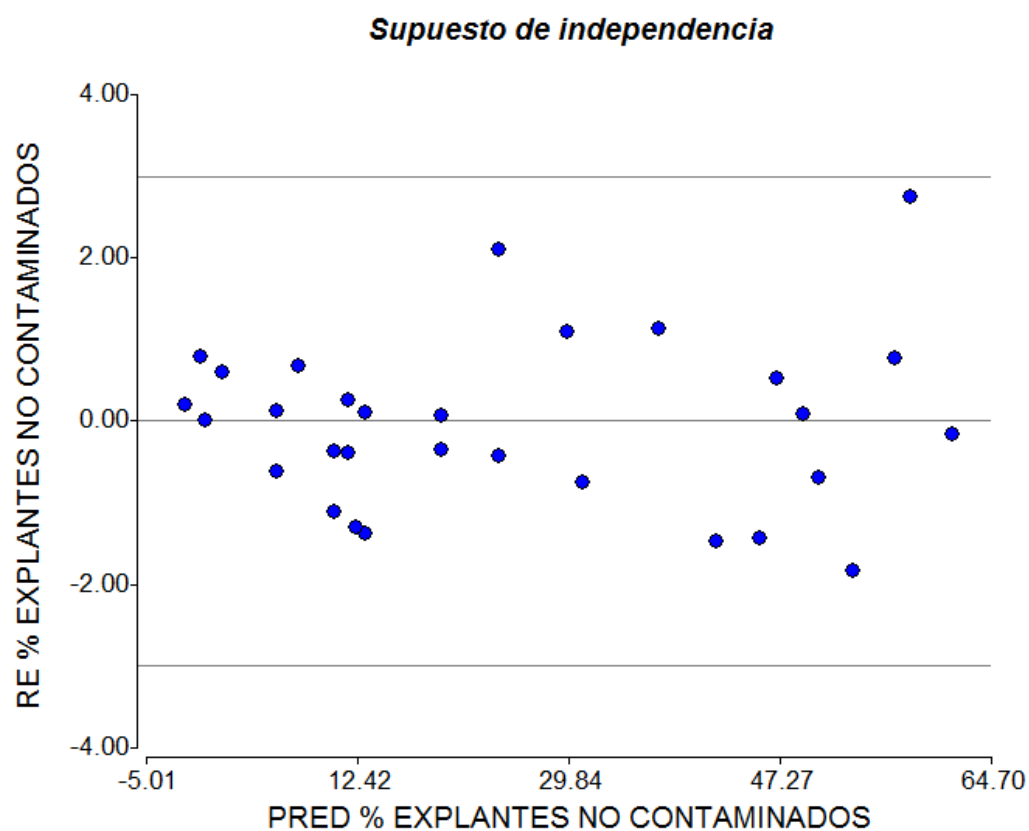
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 13A. Comprobación de los supuestos de normalidad a través de Q-Q Plot para los datos de la tercera etapa de evaluaciones, obtenido a través de Infostat® 2018.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 14A. Histograma con ajuste de distribución normal, para comprobación de supuestos en los datos de la tercera etapa de evaluaciones, obtenido a través de Infostat® 2018.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 15A. Diagrama de dispersión para comprobación del supuesto de independencia o homogeneidad de varianzas, obtenido a través de Infostat® 2018.



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA -FAUSAC-
AREA INTEGRADA - EPS-



DICTAMEN DEL SEMINARIO "REUNIÓN ACADÉMICA II"

Nombre: Madelin Massiel Minchez Arias

Carné: 201603399

Fecha: 13-08-21

Título: Evaluación de Procesos de Desinfección para Los Cultivos de *Catharanthus roseus*, *Gazania rigens*, *Viola x wittrockiana* e *Impatiens walleriana*, para su Establecimiento *In Vitro*. Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la Empresa Jardines Mil Flores, S.A. Amatitlán, Guatemala

TERNA EVALUADORA:

Evaluador: Ing. Juan Herrera (Ausente)

Asesor: Ing. MSc. Edgar Oswaldo Franco Rivera

Coordinador: Dr. David Monterroso Salvatierra

EVALUACIÓN:

-Presentación Oral (28/35)

-Documento (28/35)

- Total (56/70)

La terna evaluadora del seminario, Reunión Académica II, considera que el trabajo del estudiante tiene la calidad requerida para su **APROBACIÓN** y sugiere incorpore al documento las siguientes recomendaciones para finalizar el informe respectivo.

Recomendaciones: (1) Ver anotaciones en copias del documento corregidas por su asesor específico, corregir redacción en donde se indica; (2) Cuidar ortografía, atender las normas de redacción y estructura, revisar los nombres de los cultivos, comunes y técnicos: ubicación de títulos, cuadros gráficas y figuras, citas y bibliografía; (3) Elaborar listado de siglas y cuando se menciona por primera vez colocar las siglas entre guiones o parentesis, ej: Análisis de Varianza (ANDEVA); (4) Presentar las tablas después del párrafo en el cual son mencionadas; (5) Discutir los resultados de la investigación, comparar los mismos con otros trabajos de investigación que se han realizado en las mismas especies o otras; (6) Para fundamentar la recomendación sobre la identificación de los contaminantes, debe registrar más información al respecto en su marco teórico y, discutir los argumentos para realizar la identificación en sus resultados.

NOTA: Si el trabajo ha sido aprobado, incorpore las correcciones y preséntelas oficialmente a su asesor-supervisor para la finalización del informe.

Fecha de Entrega del dictamen: 26-08-21

Firma de Recibido:

Asesor-supervisor
Dr. David Monterroso Salvatierra

Director Área Integrada



cc. Estudiante Asesor-supervisor Asesor Específico Archivo



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA-FAUSAC-
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
Y AMBIENTALES-IIA-



REF. Sem. 07/2021

LA TESIS TITULADA:

"EVALUACIÓN DE PROCESOS DE
DESINFECCIÓN PARA LOS CULTIVOS DE
Catharanthus roseus, *Guzmania rigens*, *Viola x
wittrockiana* e *Impatiens walleriana*, PARA SU
ESTABLECIMIENTO IN VITRO, EN EL
LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, DE
LA EMPRESA JARDINES MIL FLORES S. A.,
AMATITLÁN, GUATEMALA, GUATEMALA,
C.A."

DESARROLLADA POR LA ESTUDIANTE:

MADELIN MASSIEL MÍNCHÉZ ARIAS

CARNE:

201603399

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES:

Ing. Agr. Juan Herrera
Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera
Dr. David Monterroso Salvatierra

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera
ASESOR

Dr. David Monterroso Salvatierra
ASESOR

Ing. Agr. Carlos Fernando López Búcaro
DIRECTOR DEL IIA

Ing. Agr. Waldemar Nuflo Reyes
DECANO

CFLB/nm
c.c. Archivo