

Protocolo para Proyecto de Investigación 2013

Título del proyecto

USO DE TÉCNICAS DE APROXIMACIÓN "LIOFILIZACIÓN Y ANÁLISIS DE IMAGEN" PARA DETERMINAR EL EFECTO DE PRODUCTOS ORGÁNICOS Y HORMONALES EN EL DESARROLLO DE CULTIVOS ORNAMENTALES (estudio de caso Caladium).

Introducción

Las plantas ornamentales son cultivadas en ambientes urbanos (plazas, sitios de recreación, caminos, calles y jardines), las cuales proveen no sólo belleza estética, debido al color de sus flores y follaje, sino también sombra, privacidad y protección (Granada y Claps 2003).

A nivel mundial existe una alta variedad de plantas cultivadas de interés y uso ornamental las cuales pueden ser árboles, arbustos, hierbas y lianas; algunas por su follaje, otras por sus vistosas flores; dentro de estas últimas existen algunas que se comercializan nacional y/o internacionalmente y otras que si bien no se comercializan son muy apreciadas como plantas de interiores o exteriores en las viviendas y parques públicos; dentro de este grupo sobresalen las familias Araceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Ciclantaceae, Costaceae, Heliconaceae, Marantácea, Mimosaceae, Orchidaceae, Poaceae, Rubiácea, Zamiaceae y Zingiberácea (Gutiérrez *et al*, 2010).

Dentro de la familia Araceae, se encuentra el *Caladium bicolor* que es originario de Sudamérica y de Centroamérica es una planta muy difusa por la extraordinaria belleza de sus hojas; el *Caladium* se puede propagar por semillas, cultivo de tejidos, o tubérculos. La producción de semillas requiere un tiempo de producción a largo plazo, y los resultados de la variabilidad de las plántulas, por lo tanto, utiliza sobre todo en los programas de mejoramiento. El cultivo de tejidos no es rentable, por lo que los tubérculos son muy utilizados para la producción comercial (Muhabat Shah, 2007). En donde el tubérculo es un órgano de almacenamiento que se produce en una estación de crecimiento, permanece durmiente durante el invierno y luego funciona para regenerar nuevos brotes en la primavera siguiente. Después de que inicia un nuevo ciclo estacional, los brotes utilizan el alimento almacenado (Hudson *et al*, 1999).

Debido a que se esta introduciendo esta nueva planta a la región donde las condiciones climáticas son diferentes a los de su origen, es necesario conocer su ciclo fenológico por lo que con la aplicación de productos orgánicos y hormonales se pretende satisfacer las necesidades nutricionales. Y con el uso de la técnica de análisis de imagen conocer su crecimiento tanto de raíz y tubérculo y con la liofilización poder determinar las reservas nutritivas. Con ambas técnicas se podrá conocer el desarrollo fenológico de este cultivo ornamental.

Objetivos

- Inducir el crecimiento de tubérculos y densidad de raíz de plantas ornamentales "Caladium" mediante la aplicación de productos orgánicos y hormonales.
- Monitorear las reservas nutrimentales almacenadas (Proteínas y Almidones) durante el desarrollo fenológico del Caladium (brotación, floración y dormancia).

Hipótesis

Al menos un tratamiento, orgánico u hormonal, muestra un efecto positivo en el tamaño del tubérculo y determina la concentración de proteínas y almidones durante el ciclo vegetativo del "Caladium".

Revisión de Literatura

Descripción del Caladium

El Caladium, comúnmente conocido como "Ala de Ángeles" pertenece a la familia Araceae. Tiene siete especies importantes, que son todos tropicales y proceden de la cuenca del Amazonas, en áreas como América del Sur. Hay alrededor de 100 diferentes variedades disponibles, en el mercado comercial con sólo un 20 que componen el grueso de la producción (Shah *et al.*, 2007). Es una planta de follaje de colores, que puede ser utilizado como cultivo olla o como planta del lecho al aire libre. Es fácil de cultivar y mantener, y tienen pocas plagas o problemas de enfermedades, lo que hace que sea un cultivo rentable en términos de costes de producción. La mayor parte de la producción del campo Caladium tiene lugar en la Florida Central y es una industria de 2 millones de dólares en todo el estado. El noventa y cinco por ciento de todos los caladios de campo cultivadas se cultivan en Lake Placid, Florida, que es conocida como la capital Caladium del mundo (Zhu *et al.* 1993).

Clasificación botánica.

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)
División : Magnoliophyta (ex Angiospermae)
Clase: Liliopsida (ex Monocotiledóneas)
Subclase: Alismatidae
Orden: Alismatales
Familia: Araceae
Género : Caladium

La planta alcanza de 40 a 90 cm de altura con hojas de 15 y 45 cm de largo y ancho, respectivamente. Son plantas herbáceas con tubérculos. Las hoja son radicales, es decir, nacen directamente del tubérculo, aparecen al final de largos tallos (hasta 30 cm de altura) y pueden llegar a medir hasta 60 cm de longitud, el color es muy variado: sobre una base verde, de distinta tonalidad, se alternan matices muy delicados que van desde el marfil al rosa, del blanco al carmesí o al rojo, con dibujos de muchas formas. Se exponen a la luz, pero no al sol. Se plantan al finalizar el invierno. Se multiplican por división de los pequeños tubérculos que se forman alrededor de los tubérculos adultos, la división se hace en el mismo momento de plantarlos, es decir, en febrero-marzo. En florida se producen comercialmente tubérculos de Caladium. Los tubérculos se cortan en secciones, de ordinario con dos yemas cada una. Estas secciones se plantan en surcos separados entre si de 45 a 60 cm. a una profundidad de 7.6 a 9 cm. Y

a una distancia de 9 a 15 cm en el surco. La cosecha se inicia en noviembre. Después de la cosecha, los tubérculos se secan en galpones abiertos durante 6 semanas, o artificialmente durante 48 horas. El almacenamiento posterior debe hacerse a más de 16°C. (Hudson *et al*, 1999).

Efectos fisiológicos de las auxinas y citocininas en plantas

~~Las auxinas influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, en algunos de ellos interactuando con otras fitohormonas. Diversos bioensayos han sido descritos para analizar respuestas a auxinas, los cuales han sido útiles en la identificación de compuestos con actividad típica de auxinas y de plantas mutantes con defectos en la síntesis, metabolismo o respuestas a auxinas. Uno de los ensayos que caracterizan el efecto de auxinas en el desarrollo es la regulación del crecimiento radicular el cual es definido desde el desarrollo embrionario (Jenik *et al*. 2005). Mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleoptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias. Plantas que son tratadas con inhibidores de transporte de auxinas o plantas mutantes defectuosas en transportar auxina muestran deformidades en las inflorescencias y en la arquitectura floral, lo que sugiere que esta hormona es necesaria para un adecuado desarrollo de flores (Pfluger *et al*. 2004). De igual manera la aplicación de auxina en forma exógena induce el desarrollo floral en varias especies. Asimismo, auxina contribuye con el crecimiento normal de frutos.~~

Debido a que los efectos de las citocininas en plantas están relacionados principalmente en la capacidad de estimular la división y la diferenciación celular junto a otros reguladores de crecimiento (auxinas), se les utiliza en la propagación clonal de material ornamental o forestal, de calidad superior y en la regeneración masiva de plantas elite. Por otro lado, debido a que las citocininas retardan la senescencia, proceso que implica clorosis por degradación de la clorofila, y dado que permiten la manutención de la síntesis de proteínas, junto a carbohidratos y otros compuestos orgánicos, es posible usar dicha hormona para dilatar y mantener la vida de flores con hojas. Lo anterior es relevante en la producción de flores de corte, material que con estas características implican una ganancia comercial adicional, especialmente se considera la demandas en el mercado de exportación. (Jordán *et al.*, 2006)

En las Plantas después de que inician un nuevo ciclo estacional, los brotes utilizan el alimento almacenado en un tubérculo viejo. A medida que se desarrolla el nuevo tallo, se inician en la base raíces adventicias y las yemas laterales crecen horizontalmente en el suelo para producir tallos largos y ahilados (estolones), El alargamiento continuado de los estolones se efectúa con fotoperiodos largos y está asociado con la presencia de auxina y giberelina (Hudson *et al*, 1999).

Ácidos fúlvicos en la agricultura.

La utilización de productos orgánicos que permiten a los agricultores obtener mayores rendimientos sin alterar el medio ambiente es una de las tendencias mundiales de nuestros tiempos. En este sentido, los ácidos fúlvicos están despertando el interés de los productores del campo, ya que entre sus múltiples beneficios posibilitan un mejor aprovechamiento de fertilizantes foliares y radicales, además de estimular el crecimiento general de la planta, lo cual se traduce en mayores rendimientos y mejor calidad de cosechas. Con la aplicación de los ácidos fúlvicos se han obtenido incrementos de producción de hasta de 50 por ciento en diferentes cultivos y zonas del país y Centroamérica. Se les atribuye el mejoramiento de la calidad de cultivos, como en papa, donde mejora la distribución de los almidones y el tamaño de la misma es más uniforme; en trigo aumenta los contenidos de proteínas; en el tomate, chile y otras hortalizas aumenta el porcentaje de fruto de exportación.(Anónimo, 2002)

Localización del sitio experimental.

El experimento se establecerá en las instalaciones del invernadero ubicado en el fraccionamiento, "Las Trojes", carretera antigua Torreón - San Pedro, Torreón Coahuila.

Área experimental y Distribución de tratamientos.

El área experimental estará conformado por 25 macetas por tratamiento (repeticiones), las cuales contienen sustrato Peat moss, donde se establecerá el tubérculo para su desarrollo vegetativo. El diseño estadístico será Bloques al azar donde los tratamientos se describen a continuación:

Tratamiento	Material orgánico y hormonal	Dosis (ml/maceta)
T1	Testigo	0
T2	Ácidos fúlvicos	4ml.
T3	Ácidos fúlvicos	8ml.
T4	Auxinas	4ml.
T5	Citocininas	4ml.
T6	Auxinas+Citocininas	4ml.

Se iniciará con la aplicación de los tratamientos un día después de plantar el tubérculo directamente a las macetas, para proceder con el monitoreo y medición de variables durante todo su ciclo vegetativo. Se realizará una aplicación de productos hormonales posterior a la siembra del tubérculo, por el contrario en los ácidos fúlvicos se realizaran dos aplicaciones posterior a la siembra y en floración

Variables a evaluar.

Las variables a evaluar en el presente experimento serán las siguientes:

- Altura de planta.
- Número de hojas por planta.
- Grosor del tallo.
- Área foliar
- Diámetro de tubérculo.
- Densidad de raíz.
- Reservas nutrimentales (Proteínas y Almidones)

Estas variables serán medidas en diferentes etapas durante el proyecto y se describen a continuación:

Una vez aplicados los tratamientos, se realizará el monitoreo a las siguientes variables, iniciando desde el brote hasta la etapa de dormancia. Las Etapas 1 y 2 se medirán cada 15 días. En la Etapa 3, en brotación, durante y después de la etapa de floración y dormancia.

Etapa 1. Las primeras cuatro variables serán medidas en campo durante todo el ciclo vegetativo. Se medirán con un vernier el cual nos dará los datos en milímetros, que servirán para observar el crecimiento del cultivo y observar los cambios de acuerdo a los tratamientos aplicados.

Etapa 2. Las variables de densidad de raíz y diámetro de tubérculo, se realizará en el Invernadero empleando la técnica de análisis de imagen.

El procedimiento en la medición de la densidad de raíz y tamaño de tubérculo, consistirá inicialmente en tomar 3 muestras al azar por tratamiento, para después sacar la planta de la maceta y se limpiar la raíz y el tubérculo retirando todo el sustrato para dejarlos visibles; posteriormente, se realizará la digitalización de la muestra con una cámara digital marca Olympus con sensor óptico CCD de 4.1 megapíxeles. Se colocará papel milimétrico para usarlo como guía de medición y tomarla de cuadro base. Todas las imágenes serán capturadas a la misma distancia para obtener un igual número de píxeles y área del papel milimétrico. El tratamiento de imagen se realizará con ayuda del analizador Image Pro Plus® versión 4.5 (Media Cibernética Maryland, USA) bajo micro computadora personal en base a las imágenes tomadas (González *et al.*, 2005).

Una vez tomadas las imágenes, la planta se depositará nuevamente a su maceta y tratamiento correspondiente, para que continúe con su desarrollo y realizar posteriores mediciones.

Etapa 3. Las reservas nutrimentales serán evaluadas en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED.

Se tomarán 3 macetas con planta de *Caladium* por tratamiento, las cuales se llevarán al laboratorio para su análisis en cada etapa vegetativa: brotación (en el mes de marzo), durante y después de la etapa de floración (en el mes de junio y agosto) y dormancia (en el mes Noviembre).

Posteriormente se trabajará en tres pasos para la determinación de reservas nutrimentales.

- **Paso 1. Congelación de la planta.** El objetivo principal de congelar la planta es de que no pierda sus compuestos nutrimentales. Primeramente se lavará la planta, la cual será separada en sus componentes: Raíz, Tubérculo y Hojas-tallo. Se depositarán en bolsas de papel aluminio y se aplicará nitrógeno líquido para llevar las muestras a una ultracongeladora la cual conserva una temperatura de -80°C . En esta se guardaran hasta que se pasen a la liofilizadora.
- **Paso 2. Liofilización.** Esta etapa consistirá en extraer el agua de la planta que esta en estado sólido (congelada) sin pasar por estado líquido, ya que de lo contrario se perderían compuestos nutrimentales de la planta. Las muestras que se encuentren en la ultracongeladora se pasaran a la liofilizadora para eliminar el agua contenida en la raíz, tubérculo y hojas-tallo; posteriormente las partes de la planta serán molidas para determinar las reservas nutrimentales.

- **Paso 3. Reservas nutrimentales.** En esta etapa del experimento se determinarán las proteínas y almidones que contienen las diferentes partes de las plantas ya que serán indicadores de gran importancia para conocer el desarrollo fisiológico del *Caladium* y las necesidades nutrimentales que presenta.

Diseño estadístico e interpretación de resultados.

Bajo un diseño de bloques al azar y después de obtener los datos de campo, se realizará el análisis estadístico en el paquete computacional SAS ver. 9.0 para rechazar o aceptar la hipótesis planteada e interpretar los resultados de cada una de las variables evaluadas.

Al término del análisis de datos, se realizarán artículos científicos de este trabajo para ser publicados en revistas científicas y eventos de divulgación científica y/o tecnológica.

Cronograma de actividades 2013

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Análisis de reservas nutrimentales en Hojas, tallo, raíz y tubérculo (Ciclo 2012)	X	X										
Análisis e interpretación de raíz (ciclo 2012)	X	X										
Preparar material en invernadero (macetas, tubérculos, peat moss)	X	X	X									
Plantación de tubérculos del <i>Caladium</i>			X									
Aplicación de productos orgánicos			X	X								
Fertilización				X	X	X	X	X	X			
Digitalización del crecimiento de la raíz de la planta. (Análisis de Imagen)			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Liofilización y Análisis de proteínas y almidones en <i>Caladium</i> en la etapa de brotación			X	X								
Liofilización y Análisis de proteínas y almidones en <i>Caladium</i> en la etapa de floración y después de floración.						X	X	X	X			
Liofilización y Análisis de proteínas y almidones en <i>Caladium</i> en la etapa de dormancia.											X	
Interpretación de resultados												X

5.-Productos esperados

- Publicación de resultados y/o avances en eventos de divulgación científica y tecnológica (Congresos nacionales o internacionales, foros, simposios, etc.)
- Publicación de Artículos científicos
- Tesis y grado de Doctor en Ciencias Agrarias.

6.-Literatura citada

- Anónimo. 2001. Ácido fúlvico, más crecimiento, calidad y rendimiento. *Revista Agro 2000*. Disponible en: <http://www.2000agro.com.mx/agroindustria/acido-fulvico-mas-crecimiento-calidad-y-rendimiento/> consultado : 10 de diciembre de 2012
- Hartmann T. H., Kester E. D. 1999. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. Séptima reimpresión. México D.F. Pp. 532-534.
- González C. G., Villanueva D. J., Orona C. I. y Sánchez C. I. 2005. Efecto de la lámina de riego en el crecimiento radial de nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch) mediante análisis de imágenes. *Agrofaz*, Vol. 5 Núm. 2. Pp. 863-868.
- González Y.L. Quinto V. Z., 2010. *Plantas ornamentales desde la estación ambiental de Tutunendo, Chocó*.
- Granada de Willink M., Claps. I. E. 2003. *Systematics, Morphology and Physiology Cochinillas (Hemiptera: Coccoidea). Presentes en Plantas Ornamentales de la Argentina*. Argentina.
- JENIK PD & MK BARTON. 2005. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132: 3577-3585.
- Jordán M., Casaretto J., 2006. *Fisiología Vegetal Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. Ediciones Universidad de La Serena. La Serena, Chile.
- Shah M., Mateen A., Amin N. 2007. Effect of various amended organic media on The tuberization of caladium cultivars. Department of Horticulture, Faculty of Crop Production Sciences, NWFP Agricultural University, Peshawar. *Sarhad J. Agric.* Vol. 23, No. 4.
- Zhu, Y., S. Yazawa and T. Asahira. 1993. Varietal differences in leaf color variation of plants regenerated from in vitro culture of leaf blade in caladium cultivars. *J. Japanese Society Hort. Sci.* 62(2): 431-435.