

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANGOLQUÍ**

**“EVALUACIÓN DEL CONTROL DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIANTE  
LA APLICACIÓN DE AGENTES ANTIBIÓTICOS EN ROSAS.”**

**MORILLO GÓMEZ SANTIAGO XAVIER**

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIO**

**SANGOLQUÍ – ECUADOR  
2011**

**“EVALUACIÓN DEL CONTROL DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIANTE  
LA APLICACIÓN DE AGENTES ANTIBIÓTICOS EN ROSAS.”**

**MORILLO GÓMEZ SANTIAGO XAVIER**

**REVISADO Y APROBADO**

.....  
**Ing. Patricia Falconi**  
**DIRECTOR DE CARRERA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Ing. Elizabeth Urbano  
**DIRECTOR**

Ing. Abraham Oleas  
**CODIRECTOR**

.....  
**SECRETARÍA ACADÉMICA**

**“EVALUACIÓN DEL CONTROL DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIANTE  
LA APLICACIÓN DE AGENTES ANTIBIÓTICOS EN ROSAS.”**

**MORILLO GÓMEZ SANTIAGO XAVIER**

**APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE  
CALIFICACIÓN DEL INFORME TÉCNICO.**

	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Elizabeth Urbano <b>DIRECTOR</b>	_____	_____
Ing. Abraham Oleas <b>CODIRECTOR</b>	_____	_____

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN  
ESTA SECRETARÍA.**

**SECRETARÍA ACADÉMICA**

## RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de establecer la eficiencia de antibióticos, en el control de *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal de la agalla de la corona en *Rosa* sp. La investigación se llevó a cabo en dos fases: En la fase de Laboratorio en donde se comprobó *in vitro* la eficiencia de antibióticos en el control de *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el número de unidades formadoras de colonias (ufc) en caja Petri. Los antibióticos que permitieron el menor número de (ufc) fueron Agry-gent en una dosis de 0.0875 (g/70ml A.N) y Bostok en una dosis de 210 (ul/70ml A.N) que corresponden a las dosis curativas recomendadas de los antibióticos.

Por otro lado en la fase de campo (invernadero) se procedió a la extirpación de los tumores de las plantas marcadas previamente y se aplicaron tratamientos: (T1) Agry-gent a una dosis de 1,25 g/l, (T2) Bostok a una dosis de 3 cc/l obtenidos de la evaluación *in vitro* y T3 Testigo solo extirpación. En donde el mayor porcentaje de regeneración de agallas correspondió al testigo (solo extirpación) con un 42% de regeneración en plantas tratadas; consecuentemente los tratamientos con Agry-gent y Bostok limitaron el crecimiento con un porcentaje de regeneración de 12 y 8% respectivamente. Bajo la aplicación del antibiótico Bostok se logró un mejor tamaño de brotes con una media de 44.17 cm, longitud de tallo de 37.56 cm y tamaño del botón de 4.74 cm.

## ABSTRACT

The present study was realized in order to establish the efficiency of antibiotics, in the control of *Agrobacterium tumefaciens*, causal agent of the gall-nut of the crown in Rose sp. The investigation was carried out in two phases: In the laboratory phase where the efficiency of antibiotics was verified *in vitro* in the control of *Agrobacterium tumefaciens*, by means of the number of forming units of colonies (ufc) in box Petri. The antibiotics that allowed the minor number of (ufc) were Agry-gent in a dose of 0.0875 (g/70ml A.N) and Bostok in a dose of 210 (ul/70ml A.N) that correspond to the curative doses recommended of the antibiotics.

On the other hand in the field phase (greenhouse) one proceeded to the extirpation of the tumors of the plants marked before and treatments were applied: (T1) Agry-gent to a dose of 1,25 g/l, (T2) Bostok to a dose of 3 cc/l obtained of the *in vitro* evaluation and T3 alone Witness extirpation. Where the major percentage of regeneration of tonsils corresponded to the witness (alone extirpation) with 42 % of regeneration in treated plants; consistently the treatments with Agry-gent and Bostok bordered the growth on a percentage of regeneration of 12 and 8 % respectively. Under the application of the antibiotic Bostok a better size of outbreaks was achieved by an average of 44.17 cm, length of stem of 37.56 cm and size of the button of 4.74 cm

## CERTIFICACION

**Ing. Máster Elizabeth Urbano**

**Ing. Msc. Abraham Oleas**

**Certifican:**

Que el trabajo titulado “**EVALUACIÓN DEL CONTROL DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIANTE LA APLICACIÓN DE AGENTES ANTIBIÓTICOS EN ROSAS.**”, realizado por Santiago Xavier Morillo Gómez, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Diego Andrés Morillo Gómez que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, Octubre de 2011

---

**Ing. Máster.Elizabeth Urbano**  
DIRECTOR

---

**Ing. Msc.Abraham Oleas**  
CODIRECTOR

## DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

SANTIAGO XAVIER MORILLO GÓMEZ

### **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “**EVALUACIÓN DEL CONTROL DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIANTE LA APLICACIÓN DE AGENTES ANTIBIÓTICOS EN ROSAS.**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Octubre de 2011.

---

Santiago Xavier Morillo Gómez

## AUTORIZACIÓN

Yo, Santiago Xavier Morillo Gómez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “**EVALUACIÓN DEL CONTROL DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIANTE LA APLICACIÓN DE AGENTES ANTIBIÓTICOS EN ROSAS.**”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolqui, Octubre de 2011

---

**Santiago Xavier Morillo Gómez**

## **DEDICATORIA**

A mis padres que han sido mi apoyo en todo momento,  
mis hermanos, mi novia, amigos, director, codirector,  
biometrista, que han estado a mi  
lado en todo momento.

**Santiago Morillo G.**

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente a Dios, por regalarme la vida y salud para mis actividades.

A mi familia por el apoyo incondicional en todo momento y ayudarme a llegar hasta el final.

A la Ingeniera Elizabeth Urbano, por haberme apoyado incondicionalmente en el desarrollo de la tesis.

A los Ingenieros Abraham Oleas, Gabriel Suarez y Licenciado Taco por haberme brindado su ayuda y sus conocimientos para este trabajo.

A mi novia y mis amigos por su apoyo incondicional todo el tiempo.

**Santiago Morillo G.**



2.2	ANTIBIÓTICOS	22
2.2.1	Agry-gent	22
2.2.2	Solarium	22
2.2.3	Bostok	23
2.2.4	Enrofloxacin	24
2.2.5	Oxitetraciclina	24
2.3	CULTIVO DEL ROSAL	25
2.3.1	Taxonomía y Morfología	25
2.3.2	Material vegetal	26
2.3.2.1	Clasificación de los principales cultivares	26
2.3.2.2	Variedades cultivadas invernadero IASA I	27
2.3.3	Propagación	27
2.3.4	Factores que determinan la calidad	28
2.3.5	Labores culturales, siembra y poscosecha	29
2.3.6	Enfermedades	29
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
3.1	UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN	31
3.1.1	Ubicación política	31
3.1.2	Ubicación geográfica	31
3.1.3	Ubicación ecológica	31
3.2	MATERIALES	32
3.3	MÉTODOS	33
3.3.1	Diseño experimental	38
3.3.1.1	Factores a probar	38
3.3.1.2	Tratamientos a comparar	40

3.3.1.3 Tipo de diseño	41
3.3.1.4 Características de la UE	41
3.3.1.5 Croquis del diseño	42
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>VII. RESUMEN</b>	<b>62</b>
<b>VIII. ABSTRACT</b>	<b>63</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>64</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág
<b>Cuadro 3.1:</b> Dosis de antibióticos <i>in vitro</i>	39
<b>Cuadro 3.2:</b> Antibióticos utilizados en campo (invernadero)	39
<b>Cuadro 3.3:</b> Tratamientos <i>in vitro</i>	40
<b>Cuadro 3.4:</b> Tratamientos en campo invernadero	41
<b>Cuadro 4.1:</b> Análisis de varianza para las ufc's de <i>Agrobacterium tumefaciens in vitro</i> a las 24, 48, 72 y 144 horas bajo el efecto de 5 antibióticos a tres dosis.	44
<b>Cuadro 4.2:</b> Efecto de los productos sobre las ufc's de <i>Agrobacterium tumefaciens in vitro</i> en las evaluaciones establecidas a las 24,48,72 y 144 horas.	45
<b>Cuadro 4.3:</b> Efecto de los tratamientos sobre las ufc's de <i>Agrobacterium tumefaciens in vitro</i> en las evaluaciones establecidas a las 24, 48, 72 y 144 horas.	47
<b>Cuadro 4.4:</b> Análisis de varianza para las evaluaciones del tamaño de tumores de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.	49
<b>Cuadro 4.5:</b> Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de los tumores de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, y 30 días.	50
<b>Cuadro 4.6:</b> Análisis de varianza para las evaluaciones de los % de regeneración de tumores de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en en cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.	51

<b>Cuadro 4.7:</b> Efecto de los tratamientos sobre el % regeneración de los tumores de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en el cultivo de rosas Wow a los 15, 30, 45 días.	52
<b>Cuadro 4.8:</b> Análisis de varianza para el tamaño de brotes en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.	53
<b>Cuadro 4.9:</b> Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de brotes en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.	53
<b>Cuadro 4.10:</b> Análisis de varianza para la longitud de tallos en el cultivo de rosas variedad Wow.	54
<b>Cuadro 4.11:</b> Efecto de los tratamientos sobre la longitud de tallos en el cultivo de rosas variedad Wow.	55
<b>Cuadro 4.12:</b> Análisis de varianza para el tamaño de botón en el cultivo de rosas variedad Wow.	56
<b>Cuadro 4.13:</b> Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de botón en el cultivo de rosas variedad Wow.	56
<b>Cuadro 4.14:</b> Beneficio bruto, costo variable y beneficio neto de los tratamientos en estudio	57
<b>Cuadro 4.15:</b> Análisis de dominancia de los tratamientos en estudio	58
<b>Cuadro 4.16:</b> Análisis marginal de los tratamientos no dominados	58

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°	Pág
<b>Gráfico 2.1:</b> Ciclo patológico de la agalla de la corona producida por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	17
<b>Gráfico 4.1:</b> Efecto de los antibióticos sobre las unidades formadoras de colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens in vitro</i> en las evaluaciones a las 24, 48, 72 y 144 horas	46
<b>Gráfico 4.2:</b> Efecto de los tratamientos en base de antibióticos sobre la ufc's de <i>Agrobacterium tumefaciens in vitro</i> en las evaluaciones establecidas a las 24, 48, 72 y 144 horas.	48
<b>Gráfico 4.3:</b> Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de los tumores de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.	50
<b>Gráfico 4.4:</b> Efecto de los tratamientos sobre el % de regeneración de los tumores de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.	52
<b>Gráfico 4.5:</b> Efecto de los tratamientos sobre la calidad de brotes en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.	54
<b>Gráfico 4.6:</b> Efecto de los tratamientos sobre la longitud de tallos en el cultivo de rosas variedad Wow.	55
<b>Gráfico 4.7:</b> Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de botón en el cultivo de rosas variedad Wow.	57

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>FOTOGRAFÍA N°</b>	<b>Pág</b>
<b>Fotografía 2.1:</b> Agalla de la corona en rosa variedad Wow invernadero de la Carrera.	5
<b>Fotografía 2.2:</b> Fotografía electrónica de <i>A. tumefaciens</i> mostrando los flagelos peritricos característicos	11
<b>Fotografía 2.3:</b> Colonias de <i>A. tumefaciens</i> .	11

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO N°</b>	<b>Pág</b>
<b>ANEXOS 1:</b> Regresión y coeficiente de determinación entre las dosis de los antibióticos con las ufc's	68
<b>ANEXO 2:</b> Efecto de las dosis de Bostok sobre las ufc's a las 24 horas	68
<b>ANEXO 3:</b> Efecto de las dosis de Bostok sobre las ufc's a las 48 horas	69
<b>ANEXO 4:</b> Efecto de las dosis de Bostok sobre las ufc's a las 24 horas	69
<b>ANEXO 5:</b> Efecto de las dosis de Bostok sobre las ufc's a las 144 horas	70
<b>ANEXO 6:</b> Incidencia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en rosa variedad Wow del invernadero de Carrera en porcentaje.	70

## I. INTRODUCCIÓN

*Agrobacterium tumefaciens* agente causal de la “Agalla de la corona” es una de las principales enfermedades del cultivo del rosal, que se caracteriza por la formación de tumores o agallas de tamaño y forma variables, más a menudo (inmediatamente debajo de la superficie del suelo), a nivel del cuello de la corona de las plantas, ocasionando una gran pérdida, en la producción y en la economía de las florícolas donde existe esta enfermedad (Agrios, G. 2005).

Entre los problemas que se interponen en el incremento de su producción se encuentran los fitosanitarios, especialmente la enfermedad conocida como “Agalla de la corona” por cuyo efecto las plantas afectadas disminuyen la calidad de la flor y acortan su vida útil (Navarrete, X. 1994).

Oleas (1989), citado por Navarrete, X. (1994), indica que esta enfermedad se encuentra diseminada en todo el mundo, ahora bien; en nuestro país las provincias que presentan esta enfermedad son: Pichincha, Imbabura, Cotopaxi, Azuay, entre otras, afectando no solamente a especies ornamentales sino a especies frutícolas.

Gamboa (1989), citado por Guerrero, R. (2002), señala que la importancia económica actual de la “Agalla de la Corona” es difícil de evaluar; las pérdidas debidas al atrofiamiento, desarrollo pobre de follaje y baja producción de botones florales causadas por la enfermedad, son difíciles de separar de las pérdidas causadas por otras enfermedades.

Velasteguí, R. (1999), indica que *Agrobacterium tumefaciens* tiene un 6.7% de presencia en cuanto al cultivo del rosal y un 12.5% de presencia en cultivo de *Gypsophila*; su prevalencia es considerada alta a nivel nacional.

Es por estas razones se ha considerado pertinente investigar y desarrollar, tecnologías propias de control de este problema sanitario que está presente en las plantaciones de rosas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo General

- Establecer la eficiencia de antibióticos, en el control de *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal de la agalla de la corona en *Rosa* sp.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Aislar *Agrobacterium* en medio selectivo, purificarla, conservarla y aplicar los postulados de Koch para verificar la patogenicidad
- Comprobar *in vitro* la eficiencia de antibióticos en el control de *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el número de unidades formadoras de colonias (ufc) en caja Petri.
- Aplicar una estrategia de control de la agalla de la corona en rosa, con los mejores tratamientos definidos *in vitro*.
- Determinar incidencia de la agalla de la corona en rosa variedad Wow.
- Determinar el tamaño de la agalla de la corona en rosa variedad Wow
- Determinar con que productos no se produce la regeneración de tumores en campo.
- Determinar la productividad en el primer corte
- Determinar calidad de plantas, en base a la longitud de tallo y tamaño de botón.
- Difundir la información obtenida en la investigación, al grupo meta entre los que se pueden nombrar: floricultores, estudiantes, etc.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 AGROBACTERIUM (*Agrobacterium tumefaciens*)

#### 2.1.1 Introducción

Las agallas se forman en el tallo (cuello) y raíces de las plantas infectadas, ocasionadas principalmente por bacterias del género *Agrobacterium* y por algunas especies de *Corynebacterium* y *Pseudomonas*. Pueden ser amorfas cuando presentan crecimiento excesivo de tejidos vegetales desorganizados, como ocurre con la mayoría de las agallas causadas por *Agrobacterium* y *Pseudomonas* (AGRIOS, G. 2005).

La agalla de la corona cuyo agente causal es *Agrobacterium tumefaciens* se caracteriza por la formación de tumores o agallas de tamaño y forma variables más a menudo inmediatamente debajo de la superficie del suelo, es decir, a nivel de la corona (cuello) de las plantas. Esta enfermedad ha recibido una atención extraordinaria debido que dicha bacteria modifica el material genético de sus células hospedantes, pues transfiere e incorpora al DNA de la célula hospedante parte del DNA de su plásmido Ti (llamado DNA T), el cual se expresa junto con el DNA normal del hospedante (Agrios, G. 2005).



**Fotografía 2.1: Agalla de la corona en rosa variedad Wow invernadero de la Carrera.**

Hasta ahora, *Agrobacterium tumefaciens* ha sido un ingeniero genético natural capaz de modificar el material genético de sus hospedantes, debido a que introduce parte de su material genético en sus cromosomas (AGRIOS, G. 2005).

Horst (1998) indica, que los hospederos de *Agrobacterium tumefaciens* más frecuentes son: Almendro (*Prunus amigdalus*), Ciruelo (*Prunus domestica*), Duraznero (*Prunus persica*), Rosal (*Rosa* sp), Manzano (*Malus sylvestris*), Peral (*Pyrus communis*), Vid (*Vitis vinífera*).

### **2.1.2 Taxonomía**

En 1907 Smith y Townsend aislaron por primera vez las bacterias inductoras de los tumores del cuello a las que denominaron *Bacterium tumefaciens*. Fue Conn quien advirtió en 1942 que ambas especies eran muy cercanas y similares a las bacterias que producían nódulos en legumbres. Por ello, propuso el establecimiento de un nuevo género al que denominó *Agrobacterium* (Pérez, P. Ll. 2003).

El género *Agrobacterium* se define como el grupo de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* que no fijan nitrógeno, sino que producen otros tipos de hipertrofia y son miembros de la clase alfa del *Phylum Proteobacteria* (Kerstens y De Ley, 1984).

Starr y Weiss, 1943, citados por Pérez, P. Ll. (2003) indican, que Conn incluyó en el género a los patógenos causantes de los tumores de cuello que se denominaron *A. tumefaciens*, a los saprofitos del suelo *A. radiobacter* y al patógeno *A. rhizogenes*, causante de las raíces en cabellera. Posteriormente, fue incluida una cuarta especie, *A. rubi*, que agruparía a los aislados de frambueso.

Síntesis de la clasificación Taxonómica de *Agrobacterium*:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Proteobacterias alfa

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Agrobacterium*

Principales especies

*Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium rhizogenes*

### **2.1.3. Importancia**

Holt, citado por Navarrete, X.(1994) indica, que la agalla de la corona es una de las principales enfermedades que ataca a las rosáceas cultivadas, su presencia es generalizada y sus daños han causado grandes perjuicios, ya sea sola o en asocio con otras enfermedades.

La agalla de la corona produce pérdidas económicas, (a plantas en producción), debido a que disminuye la productividad, la calidad de la flor que va decayendo poco a poco, se acorta su vida útil. Las florícolas con este problema no pueden exportar los botones florales y los costos de producción se incrementan significativamente.

Gorlenko (1961) indica, que es probable que en las plantas de rosa la enfermedad sea especialmente perjudicial cuando ocurre la infección en sus fases iniciales de desarrollo, y que consecuentemente no será mayor el efecto en plantas adultas, exceptuando cuando se desarrollan una gran cantidad de tumores en las raíces principales o en el cuello. El efecto puede ser mayor si las plantas están sujetas a condiciones desfavorables del medio.

Cardoso, citado por Navarrete, X. (1994) señala, que las tumoraciones interfieren en el buen desarrollo de las plantas, provocado por la reducción de la traslocación de agua y nutrientes y en casos severos la planta puede morir.

#### **2.1.4. Hospederos**

Sarasola, A.A. y Sarasola R.M. (1975) indican, es una enfermedad muy común que ataca tanto a plantas leñosas como herbáceas, entre las más afectas las rosáceas.

Agrios (2005) anota, que entre las bacterias fitopatógenas, *Agrobacterium tumefaciens* es la que tiene más amplio hospederos. Sarasola y Sarasola, citado por Navarrete, X. (1994) indican, que existen 61 familias de plantas dicotiledóneas susceptibles en forma natural o artificial, por otra lado las plantas monocotiledóneas son resistentes con excepción de las gramíneas Liliáceas y Aráceas. No se ha encontrado un efecto antibiótico en las monocotiledóneas para entender su resistencia, pero en pruebas se han demostrado que los extractos de avena y cebada inhiben la formación de tumores en girasol y pueden llegar a matar las células del tumor.

#### **2.1.5. Síntomas**

La enfermedad aparece al principio en forma de pequeños crecimientos excesivos del tallo y las raíces de la planta, particularmente a nivel de la superficie del suelo. En las primeras etapas de su desarrollo, los tumores son casi esféricos, blancos o de colores vivos y bastante blandos. Debido a que se originan en una herida, al principio no se pueden distinguir de una callosidad; conforme se extienden, sus superficies se hacen más o menos intrincadas. Posteriormente, los tejidos de su superficie se vuelven pardo-oscuros o negros debido a la muerte y pudrición de las células periféricas (Agrios, G. 2005).

En ocasiones no hay un indicio para distinguir los límites entre el tumor y la propia planta y el tumor aparece en forma de un hinchamiento irregular de los tejidos en torno al tallo o las raíces de la planta. Algunos tumores son esponjosos y pueden separarse de la planta con facilidad provocando una diseminación de la bacteria en el suelo. Además de formar agallas, las plantas afectadas pueden quedar atrofiadas, producen pequeñas hojas cloróticas y en general ser más susceptibles a los factores adversos del medio ambiente, con mayores problemas en invierno (Agris, G. 2005).

Sarasola y Sarasola (1975) indican, que los tumores pueden ser globosos o alargados, con la superficie mas o menos redondeada y con grietas desde afuera hacia adentro. Su tamaño tiene relación con la dimensión y vigor del órgano en que se localiza y puede oscilar entre 0.6 a 30 cm de diámetro.

Horst (1998) indica, que en ocasiones las agallas tienen una superficie demasiado lisa, lo que dificulta distinguir las de una callosidad, especialmente si es que la agalla se ubica en la base de las plantas o en el lugar del injerto o unión de brotes.

Miller, citado por Navarrete, X.(1994) explica, que la enfermedad se origina por dos tipos de desarrollo anormal:

Crecimiento exuberante de tallos y raíces, a nivel de la superficie del suelo

Protuberancias parecidas a tumores (agallas) que se forman a nivel o cerca del suelo, en uniones de injertos o raíces.

Las agallas formadas de esa manera se mantienen durante toda la época de crecimiento y desarrollan una cubierta sobre la corteza y un interior de estructura leñosa.

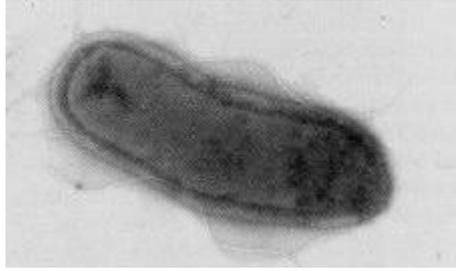
Cabe recalcar que en algunas plantas de la variedad Wow cultivadas en el IASA I se han observado, las agallas a nivel de los basales.

#### **2.1.6. Etiología**

*Agrobacterium tumefaciens* tiene forma de bastón (bacilo) y posee algunos flagelos peritricos. Las bacterias presentan características morfológicas y fisiológicas como:

- Bacilos de: 0.7 – 0.8 x 2.5 – 3.0 u sola o en pares
- Poseen de 1 – 4 flagelos , lo que les ayuda para su movimiento.
- Capsulada
- Gram negativa
- Colonias en agar: pequeñas, blancas, circulares, lisas brillantes, translucidas, enteras
- En caldo presenta ligera turbidez con película fina.
- Temperaturas óptimas; 25 – 28 °C, letal 51 °C

(Navarrete, X. 1994)



**Fotografía 2.2: Fotografía electrónica de *A. tumefaciens* mostrando los flagelos peritricos característicos**



**Fotografía 2.3: Colonias de *A. tumefaciens*.**

Agrios (2005) indica, que sobre ciertos medios las colonias son estrelladas, lo que ha sido considerado como estados del proceso sexual de ésta bacteria

Las cepas de esta bacteria exhiben diferentes grados de virulencia, sin embargo puede ser bastante estable y no se reduce apreciablemente por transferencias repetidas en medio de cultivo. Por otra parte señala que la bacteria es sensible a la luz del sol y sequia, en cambio en suelos húmedos y en ambientes con condiciones óptimas como bajo invernadero la bacteria permanece viable y virulenta durante muchos años si no tiene un tratamiento de por medio (Horst, 1998).

Las bacterias que son virulentas tienen de uno a varios plásmidos largos, uno de estos plásmidos contiene los genes que codifican para la inducción de tumores, y se lo denomina plásmido Ti (inductor de tumores). Las bacterias que carecen de este plásmido o lo pierden después de tratarlas con calor, no son virulentas. El plásmido Ti, también posee los genes que determinan la amplia gama de hospedantes de la bacteria, así como los tipos de síntomas que ocasionarán (Agrios, G. 2005).

#### **2.1.6.1 Diseminación**

Agrios, citado por Navarrete, X.(1994) señala, que la enfermedad se disemina comúnmente, por el movimiento de la tierra, por heridas provocadas por herramientas no desinfectadas, por el agua de riego, por la vestimenta de los trabajadores, por el aire, etc.

Generalmente las bacterias son más abundantes en células vegetales ubicadas ya sea cerca o en la superficie donde se desarrolla la enfermedad.

#### **2.1.6.2 Tendencia para la infección**

La tasa de infección se ve influenciada por la susceptibilidad de la planta, su vigor, desarrollo y ambiente (Horst, R. 1998).

A pesar que la bacteria pierda su patogenicidad muy rápidamente en el suelo por condiciones desfavorables mencionadas anteriormente, esta puede ser restituida por secreciones radiculares de plantas susceptibles de su alrededor (Gorlenko, M. 1961).

### **2.1.6.3 Condiciones favorables para desarrollo de la infección**

Las infecciones que se presentan durante la época de invierno pueden mantenerse latentes y por ende las plantas infectadas no mostrarán síntomas hasta que se produzca la época de verano. Las plantas que contraen la enfermedad durante periodos bajo 10 °C no desarrollan síntomas, pero las bacterias viables causan malformaciones cuando la temperatura comienza a subir. A menudo las plantas de rosa se contagian durante la excavación, lavado y almacenamiento frío. Pero no muestran síntomas hasta que se desarrolla la infección en una temperatura adecuada. (Navarrete, X. 1994).

Fernández y Valiela, citados por Navarrete, X.(1994) manifiestan, que la actividad bacteriana en el suelo es mayor durante los meses que esta retiene mayor cantidad de calor. En laboratorio las agallas se forman rápidamente cuando la temperatura oscila entre 18 y 22 °C, decrece a 30 °C y no se forman a 38 °C, la humedad óptima es de 60%. A su vez señala que los suelos húmedos y arcillosos o suelos sueltos y alcalinos bajo condiciones favorables, son los más adecuados para la difusión de la enfermedad.

*Agrobacterium tumefaciens* pierde su patogenicidad cuando el pH del suelo es menor a 5; sin embargo, la bacteria retiene su viabilidad bajo ésta condición y puede ser aislada en cultivo puro (Agrios, G. 2005).

### **2.1.7 Mecanismo de infección**

*Agrobacterium tumefaciens* capta señales de tipo fenólico, por el receptor traducido a partir del gen de virulencia *virA*; el cual le indica a la bacteria que se encuentra frente a una planta susceptible a la transformación.

Vir A presenta actividad serín-kinasa y al unirse a su ligando, fosforila, con gasto de ATP a Vir G. Una vez fosforilado, Vir G actúa como factor de transcripción para el resto de genes de virulencia. Por acción conjunta de Vir D1 y Vir D2 se escinde el t-DNA del resto del plásmido de la hebra que va de 5' a 3'. Simultáneamente, se transcribe una zona complementaria a la que se separa del plásmido. Vir D2 se coloca en el extremo derecho del t-DNA (Isodoro, 2008).

El t-DNA sale de la bacteria a través de un poro formado por Vir B. Mientras va saliendo, Vir D4 incorpora un complejo formado por Vir E1 y Vir E2, a lo largo del t-DNA. El complejo formado por Vir D2, VirE1-Vir E2 y t-DNA, entra en la célula vegetal, a través de un mecanismo poco conocido, y acompañado por VirF.

En el citoplasma vegetal, Vir E2 interacciona con VIP 1 y VIP2, lo que permite la unión de Vir F al complejo. Vir D2 presenta una secuencia NLS (secuencia de direccionamiento al núcleo), la cual es reconocida por importinas citoplasmática, que

dirigen al complejo al nucleoporo. El nucleoporo formado por distintas proteínas Nup, que permiten el paso del complejo, gracias a que la importina establece uniones transitorias con las secuencias FG de las proteínas Nup. Una vez en el núcleo Ran cambia su unión a GDP por GTP para inducir la liberación de la importina y su liberación al citoplasma.

Una vez que el t-DNA se encuentra en el núcleo, se integra dentro del genoma vegetal. La integración no es al azar, por otro lado existen zonas de integración (Isodoro, 2008).

Cada célula vegetal infectada, incorpora de una a cuatro regiones de t-DNA de distintas bacterias. El t-DNA se mantiene estable una vez integrado en el cromosoma vegetal (Isodoro, 2008).

#### **2.1.8. Desarrollo de la enfermedad**

La bacteria inverna en suelos infestados, donde vive como organismo saprófito durante varios años. Cuando las plantas hospedantes se desarrollan en dichos suelos, la bacteria penetra en las raíces o tallos que se encuentran cerca del suelo a través de heridas muy recientes producidas por labores del cultivo, injertos, insectos, etc (Agrios, G. 2005).

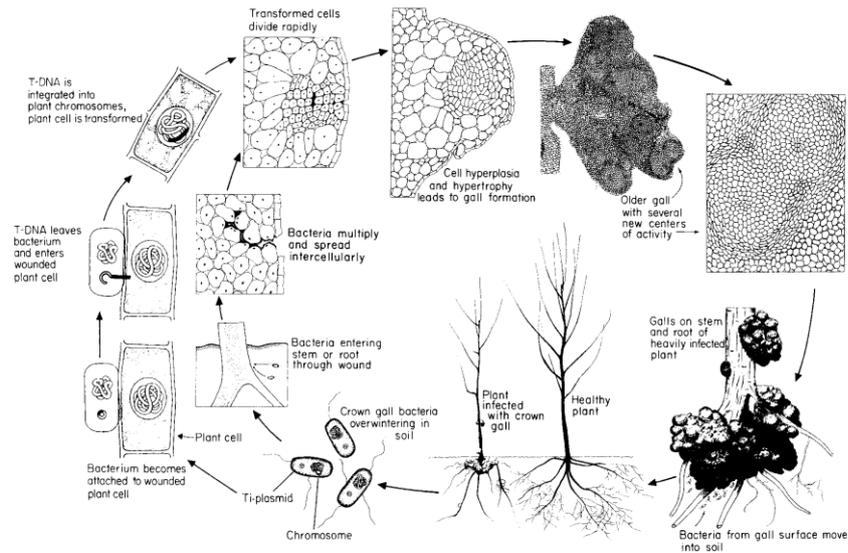
En el interior de los tejidos, las bacterias se sitúan a nivel intercelular y estimulan a las células circundantes para que se dividan. En la corteza aparecen uno o varios

grupos de células hiperplásticas, dependiendo de la profundidad de la herida. Estas células pueden contener de uno a varios núcleos, los cuales se dividen con gran rapidez produciendo células que no muestran ni diferenciación ni orientación y al cabo de 10 a 15 días después de haberse producido la inoculación se puede observar una pequeña hinchazón (Agrios, G. 2005).

Conforme aumenta el tamaño y la cantidad de las células tumorosas, ejercen cierta presión sobre los tejidos normales circundantes y subyacentes, los cuales pueden deformarse o aplastarse. La compresión de los vasos xilémicos a causa de los tumores, disminuye la cantidad de agua que llega a la parte superior de la planta hasta un 20% del nivel normal (Agrios, G. 2005).

Agrios, G.(2005) señala, que cuando los tejidos están muy jóvenes y en proceso de crecimiento son infectados por el patógeno, además del tumor primario que se desarrolla en el punto de infección, aparecen varios tumores secundarios. Estos se forman por debajo del tumor primario y a distancias variables entre él.

El proceso que fue descrito anteriormente, se expresa prácticamente en el Gráfico 4, donde se describe el ciclo de vida de *Agrobacterium tumefaciens*.



**Gráfico 2.1 Ciclo patológico de la agalla de la corona producida por *Agrobacterium tumefaciens* (Agrios, G. 2005)**

### 2.1.9 Plásmido Ti

El plásmido Ti es replicativo, de doble cadena, circular y de gran tamaño; que oscila mucho de unas cepas a otras, pudiendo llegar a las 300Kb.

Su tamaño medio es cercano a las 200 kb. En él se encuentran genes de virulencia, de síntesis y catabolismo de opinas (como octopina o nopalina) y de síntesis de fitohormonas

La región del plásmido que se transfiere a la a la célula huésped, se denomina t-DNA. En ella, se encuentran genes para la síntesis de una o varias auxinas, de una o varias citoquininas y de opinas. Las auxinas y citoquininas son las responsables de la formación del tumor, por proliferación y crecimiento exacerbados de las células vegetales. Las opinas son derivados de aminoácidos, que sirven de principal de

nutriente de *Agrobacterium tumefaciens*, sirviéndole a la bacteria de fuente de energía, por oxidación aerobia.

La región t-DNA, se encuentra flaqueada por dos secuencias constituidas por repeticiones directas de 23 nucleótidos, en alguna ocasión 25, que delimitan que zona del plásmido se va a movilizar. Estas secuencias se denominan borde derecho e izquierdo del t-DNA. Todo lo ubicado entre ambas, pasará a la célula vegetal. Los genes de virulencia son los encargados de transferir y proteger el t-DNA. Se encuentran como un operón.

Chilton *et al.*, (1977) indica, que el t- ADN es el segmento de ADN que se transfiere desde la bacteria a la célula vegetal.

A diferencia de los elementos transponibles que pueden moverse repetidamente, el ADN-T una vez transferido permanece estable, y no codifica por sí mismo los productos que median su transferencia (Joos *et al.*, 1983; Leemans *et al.*, 1982; Zambryski *et al.*, 1983).

Pérez, P. Ll. (2003) indica, que el tamaño del ADN-T varía según el tipo de plásmidos, pero sólo los extremos, llamados bordes, se reconocen durante el proceso de transferencia. Estas secuencias borde dirigen la transferencia de forma polar, en dirección derecha-izquierda, determinada por la orientación de los extremos repetidos, siendo el borde derecho imprescindible para la formación del tumor.

En la región que no se transfiere quedan los genes para el catabolismo de opinas. Como todo plásmido, para poder permanecer en la bacteria sin perderse, porta el origen de replicación de *Agrobacterium tumefaciens*.

La función del plásmido es convertir a la planta en una factoría productora de opinas, para satisfacer los requerimientos energéticos de la bacteria (Isodoro, 2008).

#### **2.1.10. Control**

New y Kerr, 1972; Moore y Allen, 1986; Ophel *et al.*, 1990; Vicedo *et al.*, 1993; Raio *et al.*, 1994, citados por Pérez, P.Ll. (2003) indican, que el sistema de colonización genética desarrollado por varias especies del género *Agrobacterium* tiene como consecuencia que sólo es necesaria la presencia de la bacteria al comienzo de la infección, por lo que la lucha curativa, que busca destruir al agente patógeno una vez iniciada ésta, no tiene sentido ya que el tumor puede desarrollarse sin la bacteria, lo que condiciona que los métodos de lucha recomendados sean preventivos.

Los más utilizados consisten en: control de la calidad sanitaria de las plantas y del suelo de cultivo, medidas profilácticas de desinfección del suelo (con vapor, solarización) y del material vegetal (termoterapia, tratamiento con agua caliente), rotación de cultivos con plantas no huéspedes o plantación de variedades resistentes

Canfield *et al.*, (1992), Moore y Canfield, (1996); López *et al.*, 1989, citado por Pérez, P.LI. (2003) indican, que la lucha química se ha mostrado prácticamente ineficaz, a pesar de las numerosas materias activas ensayadas y la lucha biológica mediante la cepa K84 de *Agrobacterium*, que era el método de control más empleado, presenta diversos problemas.

Sin embargo, estos parecen haberse resuelto con la construcción de una cepa modificada genéticamente, K1026, que deriva de la cepa K84 (Jones *et al.*, 1988) pero la legislación actual respecto a estos organismos (OMG) es restrictiva respecto a su uso en Europa, y la cepa K1026 no ha sido registrada a nivel comercial en la UE.

#### **2.1.10.1 Control Cultural**

Horst, R.(1998) indica, que para evitar la diseminación de la enfermedad se deben realizar algunas prácticas:

- Observar medidas sanitarias preventivas cuando las ramas de rosa podadas se destine a propagación
- Desinfectar todas las herramientas que se utilicen para labores culturales, se las puede desinfectar con: Lirapovin, Iofec – 20, Biocid, Savloned, entre otros (Oleas, A; Padilla, F; Taco, M. 2009).
- Evitar el empleo de esquejes provenientes de plantas enfermas.
- Usar patrones resistentes.
- Mantener el agua de riego libre de contaminación.
- Evitar la producción de heridas con herramientas no desinfectadas.
- Rotación de camas, etc.

### **2.1.10.2 Control Biológico**

El control biológico de esta enfermedad se la puede realizar utilizando a la bacteria antagónica *Agrobacterium radiobacter* cepa K 84, bacteria altamente efectiva usada como medida preventiva (Horst, R. 1998).

### **2.1.10.3 Control Químico**

Usar principalmente antibióticos para minimizar la infección tales como: Agry-gent, Bostock, Solarium, penicilina, estreptomina, oxitetraciclina, vancomicina, terramicina, aureomicina cabe recalcar que los últimos tres son antibióticos muy efectivos pero no han sido empleados en la práctica para el control de la enfermedad (Navarrete, X. 1994).

Se pueden usar también productos como: Kasumin, Phyton, que actualmente están siendo utilizados para control, en bacteriosis vegetales.

## 2.2 ANTIBIÓTICOS

### 2.2.1 Agry - gent

Bactericida sistémico, bloquea e inhibe la biosíntesis de proteínas precursoras de las enzimas bacterianas que degradan los tejidos vegetales, incluyendo a aquellas cepas que han desarrollado resistencia a formulaciones (Vademecum, 1999).

Principio activo: Sulfato de Gentamicina (100 g/Kg.)  
Clorhidrato de Oxitetraciclina (300 g/Kg.)

Dosis: Preventivo: 150 g/400 litros agua  
Curativo: 150 g/200 litros agua

Presentación: Polvo Mojable (P.M) – Formulación. (Quinatoa, I. 2009)

### 2.2.2 Solarium

Fungicida Bactericida

Principio activo: Tetraciclina HCL (100 g/l)  
Cloruro de alquil dimetil bencil amonio (400 g/l)  
Urea activada – estabilizada y quelatada (500 g/l)

Dosis: Preventivo: 500 g/200 l agua  
Curativo: 800 g/l agua

Presentación: Polvo Mojable (P.M) – Formulación

### 2.2.3 Bostok

Bactericida Fungicida Sistémico

Principio activo: Tiazoles (370 g/l)  
Oxitetraciclina HCL (100 g/l)  
Ingredientes inertes (530 g/l)

Dosis: Preventiva: 1cc/l  
Curativa: 1.5-2.5 cc/l  
Drench: 3-5 cc/l

Presentación: Frasco 500 cc.

Generalidades: Controla bacterias gram negativas como *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, y gram positivas: *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*.

Controla una amplia gama de hongos Oomycetes como *Peronospora* y *Pythium* y otros de los géneros *Botrytis*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*.

Mecanismo de acción: actúa a nivel de la plasmida energética de la bacteria inhibiendo la biosíntesis de las proteínas y desacople meso somático de los electrones a nivel de cápsula y membrana celular no permitiendo el transporte de información ribosoma ni energético, interrumpiendo la fosforilación y el paso de ADP a ATP reducido.

Modo de empleo: utilizar agua de buena calidad y agitar hasta una mezcla homogénea, no utilizar herramientas ni recipientes ferrosos (<http://www.asopran.org/images/tecnicas/bostok.pdf>).

#### **2.2.4 Enrofloxacin (Baytrill 5%)**

Antibacteriano inyectable de amplio espectro para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos Gram +, Gram -

Principio activo: Enrofloxacin 50mg

Excipientes 1.0ml

Dosis: 5ml/1 l agua

Generalidades: actúa inhibiendo la girasa (enzima de la replicación) del ADN bacteriano. La aplicación proporciona una alta acción bactericida, insecticida con un éxito terapéutico seguro([http://www.ecuaquimica.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=286&catid=42&sectid=11](http://www.ecuaquimica.com/index.php?option=com_content&task=view&id=286&catid=42&sectid=11)).

#### **2.2.5 Oxitetraciclina**

Fitoplasmicida agrícola de acción sistémica. Antibiótico bacteriostático de amplio espectro. Posee un amplio espectro similar al de otras tetraciclinas, siendo efectiva contra gran número de bacterias Gram positivas y gram negativas, virus y rikettsias.

Presentación: Frasco 50 ml

( <http://www.monografias.com/trabajos5/antibio/antibio.shtml#intro59>)

## 2.3 CULTIVO DEL ROSAL

### 2.3.1. Taxonomía y Morfología

Perteneciente a la familia Rosaceae, cuyo nombre científico es *Rosa* sp.

Actualmente, las variedades comerciales de rosa son híbridos de especies de rosa desaparecidas. Para flor cortada se utilizan los tipos: té híbrida y en menor medida los de floribunda. Los primeros presentan tallos largos y flores atractivas dispuestas individualmente o con algunos capullos laterales, de tamaño mediano o grande y numerosos pétalos que forman un cono central visible.

Los rosales floribunda presentan flores en racimos, de las cuales algunas pueden abrirse simultáneamente. Las flores se presentan en una amplia gama de colores: rojo, blanco, rosa, amarillo, lavanda, etc., con diversos matices y sombras. Éstas nacen en tallos espinosos y verticales

([http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tierras/manuales/Cultivo\\_rosal.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Cultivo_rosal.pdf)).

### **2.3.2. Material vegetal**

Las cualidades deseadas de las rosas para corte, según los gustos y exigencias del mercado en cada momento, son:

Tallo largo y rígido.

Follaje verde brillante.

Flores: apertura lenta, buena conservación en florero.

Buena floración.

Buen rendimiento (tallos/m<sup>2</sup>).

Buena resistencia a las enfermedades.

Posibilidad de ser cultivados a temperaturas más bajas, en invierno y aptitud de planta para el cultivo sin suelo

([http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tierras/manuales/Cultivo\\_rosal.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Cultivo_rosal.pdf)).

#### **2.3.2.1. Clasificación de los principales cultivares**

Rosas grandes

Rojas: First Red, Dallas, Royal Red, Classy, Freedom, Sexy red, Forever young, Grabde classe, Charlotte, Black magic, etc.

Rosas: Anna, Titanic, Raphaela, High boomin, etc.

Amarillas: Golden Times, Texas, Gold strike, High yellow magic, Skyline, Good times, Sonrisa, etc.

Naranjas: Orange unique, Milva, Impulse, Exotica, Star 2000, High orange magic, etc.

Blancas: Virginia, Amelia, Vendela, Polar star, Anastacia, Proud, Mondial, etc.

Bicolores: Candia, Simona, Prophyta, La Minuette.

Multiflores (spray): Mini (diferentes colores), Golden Mini, Lidia (rosa), Nikita (rosa) (Apuntes de cátedra de Floricultura, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA, Sangolqui, 2008).

### **2.3.2.2 Variedades cultivadas invernadero IASA I**

Las variedades de rosas cultivadas en el invernadero de la Carrera son: Night fever, Luxor, Sonrisa, Wow. La variedad Wow presenta mayor incidencia de *Agrobacterium tumefaciens*.

### **2.3.3. Propagación**

La propagación se puede llevar a cabo por semillas, estacas, injertos de varetta e injertos de yema, aunque el último es el método más empleado a nivel comercial.

La reproducción por semillas está limitada a la obtención de nuevos cultivares.

Las estacas se seleccionan a partir de vástagos florales a los que se les ha permitido el desarrollo completo de la flor para asegurar que el brote productor de flores sea del tipo verdadero. Además, los brotes sin flor son menos vigorosos, por lo que poseen menos reservas para el enraizamiento.

Pueden utilizarse estacas con 1, 2 ó 3 yemas, dependiendo de la disponibilidad de material vegetal, aunque son preferibles las de 3 yemas, ya que presentan mayor longitud y más tejido nodal en la base.  
[http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tierras/manuales/Cultivo\\_rosal.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Cultivo_rosal.pdf))

#### **2.3.4. Factores que determinan la calidad**

Luz de onda visible (actividad fotosintética)

Temperatura 17 – 25 °C

Humedad relativa 75%

CO<sub>2</sub>

Calidad de agua

Calidad de suelo o sustrato

Fertirriego

Labores de cultivo

Manejo integrado de plagas y enfermedades

Proceso eficiente en Poscosecha (Apuntes de cátedra de Floricultura, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA, Sangolqui, 2008).

### **2.3.5. Labores culturales, siembra y poscosecha**

Siembra de acuerdo a densidad (75000 plantas/ha)

1 Hilera, 2 hileras

Diferentes tipos de plántulas (injertación en finca, formación de plantines, bushes).

El material debe estar sano

Desyeme

Despunte en tierno

Agobio

Tutoreo

Selección y pinch de basales

Inicio de producción selectiva (Apuntes de cátedra de Floricultura, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA, Sangolquí, 2008).

### **2.3.6. Enfermedades**

**-Agallas o tumores (*Agrobacterium tumefaciens*)**

Las agallas o tumores producidos por *Agrobacterium tumefaciens* se forman en el tallo hasta una altura de 50 cm sobre el suelo o en las raíces, penetrando por las heridas cuando la planta se desarrolla sobre suelo infectado.

## Control

-El suelo debe esterilizarse, preferentemente con vapor, antes de la siembra.

-Utilización de agentes antibióticos para su control.(NAVARRETE, X. 1994).

-El control biológico de la agalla es posible con *Agrobacterium radiobacter*

K84

([http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo tierra s/manuales/Cultivo\\_rosal.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierra_s/manuales/Cultivo_rosal.pdf))

A este cultivo también le ataca enfermedades como: Mildiu veloso o tizón (*Peronospora sparsa*), Oídio (*Sphaerotheca pannosa*), Roya (*Phragmidium disciflorum*), Moho gris o botrytis (*Botrytis cinerea*), etc.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

##### **3.1.1. Ubicación Política**

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias-IASA I, República del Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, en la Hacienda “El Prado”. Las condiciones de temperatura se encuentran entre 20-25°C y humedad relativa entre 43 y 60%.

La recolección de muestras de tumores de *Agrobacterium tumefaciens* y la fase de campo se realizó en el invernadero de rosas de la Carrera.

##### **3.1.2. Ubicación Geográfica**

La Hacienda “El Prado” se encuentra en una posición geográfica de 78°24'44'' (O) y 0° 23' 20'' (S) y a una altitud de 2748 msnm.

##### **3.1.3. Ubicación Ecológica**

El laboratorio de Fitopatología y el invernadero de rosas de la Carrera de Ciencias Agropecuarias-IASA, se encuentran ubicados en la zona de vida: Bosque húmedo pre-montano, Altitud: 2748 msnm., Temperatura mínima: 8,08°C, Temperatura máxima: 20,06°C: Temperatura promedio: 16, 35°C, Precipitación: 1200mm/año, Vegetación: Bosque primario andino (Árboles, arbusto y pastos).

Información proporcionada por el Ing. Marcelo Arce.(2010).

### **3.2. MATERIALES**

Los materiales que se utilizaron para el aislamiento de *Agrobacterium tumefaciens* fueron: navaja previamente desinfectada, alcohol antiséptico al 70%, jabón líquido, agua destilada estéril, frascos de 0,5 litros, fundas ziploc, agallas jóvenes.

Para la fase del control de *Agrobacterium tumefaciens in vitro*, se utilizó: plántulas de girasol para inocularlas con la bacteria a fin de aplicar los postulados de Koch, vasos plásticos, cepa bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens* cuya patogenicidad fue comprobada, medios de cultivo específicos, comunes, reactivos y solventes, antibióticos: Agry-gent, Solarium, Bostock, Enrofloxacin, Oxitetraciclina, tubos de ensayo, cajas petri estériles, soluciones nutritivas, parafilm, mascarillas, guantes quirúrgicos, papel toalla, alcohol antiséptico, alcohol industrial, papel aluminio, aza de platino.

Los equipos que se utilizaron *in vitro* fueron: Esterilizador o incubadora, auto clave, pH-metro, balanza analítica, refrigeradora, cámara de flujo laminar, microscopio, cámara de fotos.

Las herramientas que se utilizaron fueron: mecheros, probetas, pipetas graduadas, goteros, vasos de precipitación, buretas, botellas graduadas.

En la fase de campo se utilizaron plantas en producción de rosa variedad Wow infectadas con *Agrobacterium tumefaciens*, antibióticos: Agry-gent, Bostok, cinta de plástico para el marcaje de plantas infectadas.

Las herramientas que se utilizaron fueron: navaja esteril, bomba de mochila, equipo de jardinería, carretilla, libreta de campo.

### **3.3 MÉTODOS**

Este proyecto estuvo constituido por dos fases, las cuales se desarrollaron en laboratorio y campo, a continuación se detalla cada una de ellas.

#### **FASE DE LABORATORIO**

Aislamiento: se seleccionaron agallas jóvenes muestreadas en el invernadero de rosas de la Carrera y se los lavó con agua por un tiempo de 5 minutos aproximadamente. Se desinfectaron los tumores con hipoclorito de sodio por alrededor de cinco minutos y se los lavó con agua destilada esterilizada.

Los tumores fueron desmenuzados y colocados en pequeñas fracciones en tubos de ensayo con 2 ml de agua destilada esterilizada, donde permanecieron durante 15 – 20 minutos bajo condiciones de laboratorio con el fin de que se difundan las bacterias

Una vez obtenida la suspensión bacteriana se realizó la siembra en medio D1 de Kado y Heskett (1970).

Por último las cajas fueron colocadas en una incubadora a 24-25 °

Purificación: esta práctica se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Falconí, C. (1997).

Conservación: la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* fué conservada en el medio de cultivo YDC (extracto de levadura, dextrosa, carbonato de calcio y agar), según el protocolo utilizado en el laboratorio de Fitopatología del IASA I.

Postulados de Koch: para realizar los postulados de Koch, se inoculó el patógeno en un hospedante susceptible como: girasol. Para lo cual se preparó una suspensión de *Agrobacterium* de 24 horas de edad la misma que fue calibrada de acuerdo con el tubo de escala de Mc Farland #1 aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ml y se efectuó la inoculación con una jeringuilla de insulina que contuvo el inóculo de la bacteria. El inóculo (una gota) se depositó en el cuello de las plántulas y en las axilas de las hojas de inmediato se ejecutó una leve herida con la aguja de la jeringuilla.

Una vez inoculadas las plántulas de girasol se realizaron observaciones periódicas para establecer el desarrollo la enfermedad en las plántulas, luego de 18 días, se observó hipertrofia en los puntos de inoculación del tallo de las plántulas de girasol.

El sustrato que se utilizó para el desarrollo de las plántulas fue de tres partes de suelo (tierra negra) y una de pomina, esterilizándola a 121 °C por alrededor de quince minutos.

Reislamiento de la bacteria y control de *Agrobacterium tumefaciens* con antibióticos *in vitro*: una vez comprobada la patogenicidad de la bacteria se, seleccionaron las plántulas número cuatro y cinco (de acuerdo al número de la caja) para realizar el reislamiento de la bacteria patogénica. El procedimiento se efectuó de la misma forma a la descrita.

Una vez reislada la bacteria se transfirieron las colonias independientemente a tubos con Agar nutritivo, luego se efectuaron suspensiones madre y disoluciones  $5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-2}$  (ufc)/ml de acuerdo al tubo de escala Mc Farland #1 para establecer la concentración de trabajo que facilite el conteo en la cámara.

En la evaluación a las 24 horas de las disoluciones no se observó ninguna evidencia de ufc's de las cepas 4 y 5, a las 48 horas se observaron formaciones de colonias de cepas 4 y 5, hay que recalcar que en la disolución  $5 \times 10^{-4}$  se observó gran cantidad de colonias en formación, no se utilizó debido a que no hay como realizar el conteo en la cámara de conteo de ufc's, en la concentración  $5 \times 10^{-3}$  se observaron un buen número de colonias y en la concentración  $5 \times 10^{-2}$  casi no se observaron colonias. La disolución que se utilizó fue  $5 \times 10^{-3}$ .

Para establecer en control de los antibióticos sobre *Agrobacterium tumefaciens*, se procedió de la siguiente manera:

Se debe anotar que 24 horas antes y 72 horas después de la inoculación las plantulas se sometieron a un ambiente húmedo

- 1) Inoculación de la bacteria en medio Agar Nutritivo, durante 24 – 26 horas.
- 2) Se preparó una suspensión bacteriana en tubos con agua destilada esterilizada. En un vortex se homogenizó la suspensión y se calibró la suspensión de acuerdo a la turbidez correspondiente al tubo 3 de la escala de MacFarland.
- 3) El Agar nutritivo fue colocado en baño maria a 45 °C y se dispensó dentro de los frascos con Agar nutritivo los antibióticos con sus respectivas dosis y se vertió en cajas petri estériles. Se dispensaron en las cajas alícuotas de 0.3 ml de la suspensión sobre el agar nutritivo, se homogenizaron las cajas petri debidamente identificadas realizando movimientos circulares con la mano, a continuación, se dejó en la cámara de flujo laminar por unos 10 minutos hasta que la solución se endure y se procedió a colocarlas las cajas en una incubadora a 24 °C.

Las variables evaluadas fueron unidades formadoras de colonias (ufc)/ml a las 24, 48, 72 y 144 horas de la inoculación en las cajas petri.

## **FASE DE CAMPO**

Primeramente se marcaron las plantas de rosa variedad Wow infectadas con *Agrobacterium tumefaciens* en el invernadero y se realizó un muestreo de agallas.

El marcaje de las plantas infectadas de la variedad Wow permitió la elaboración del esquema de su distribución en el invernadero y se estableció la ubicación de los tratamientos.

Una vez marcadas las plantas infectadas con cinta de plástico para su control e identificación, se procedió a la extirpación de los tumores utilizando una navaja esterilizada previamente y después de cada extirpación se desinfectó la navaja con alcohol antiséptico al 70%, los tumores extirpados fueron medidos con un pie de rey para su evaluación e inmediatamente se aplicó los antibióticos: Agry-gent con una dosis de 1,25g/l, y Bostok con una dosis de 3 cc/l, cabe recalcar que estas dosis fueron establecidas del control *in vitro*, pues demostraron los mejores resultados

Al día siguiente se realizó una poda de todas las plantas marcadas a nivel de los basales para ir evaluando las variables: regeneración de tumores, tamaño de brote, y posteriormente longitud de tallo y tamaño de botón. La segunda aplicación de antibióticos, se realizó a los 16 días y la tercera a los 32 días, con los mismos productos y las mismas dosis.

Las evaluaciones de las variables se efectuaron de acuerdo al cronograma establecido en el ensayo, que era cada 15 y 30 días dependiendo de la variable a partir de la extirpación de las agallas y primera aplicación de los antibióticos.

Las variables que se evaluaron fueron: tamaño de tumores, regeneración de tumores, tamaño de brotes, longitud de tallo y tamaño de botón.

### **3.3.1. Diseño experimental**

#### **3.3.1.1 Factores a probar**

##### Laboratorio

Los factores que se probaron en la fase de laboratorio fueron los antibióticos:

A1	Agry – gent
A2	Bostok
A3	Solarium
A4	Enrofloxacina
A5	Oxitetraciclina

Cada antibiótico fue probado a tres dosis, estas fueron:

**Cuadro 3.1:** Dosis de antibióticos *in vitro*

DOSIS	ANTIBIOTICOS				
	AGRY-GENT (g/70ml A.N)	SOLARIUM (g/70ml A.N)	BOSTOK (ul/70ml A.N)	ENROFLOXACINA (ul/70ml A.N)	OXITETRA CICLINA (ul/70ml A.N)
D1	0.0175	0.14	140	18	4
D2	0.0525	0.175	175	35	6
D3	0.0875	0.21	210	53	8

Campo

En fase de campo los factores que se probaron fueron los dos mejores antibióticos seleccionados en el ensayo de Laboratorio, los cuales fueron Agry-gent y Bostok, a dosis establecida de acuerdo al control *in vitro*.

**Cuadro 3.2:** Antibióticos utilizados en campo invernadero

DOSIS	TRATAMIENTOS		
	Agry-gent (g/l)	Bostok (cc/l)	Extirpación sin antibiótico
D3	1,25	3	0

### 3.3.1.2. Tratamientos a comparar

Los tratamientos a comparar fueron el resultado de la combinación de antibióticos + Dosis. Cada antibiótico constituyó un tratamiento.

#### Laboratorio

**Cuadro 3.3:** Tratamientos *in vitro*

No TRATAMIENTOS	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN
1	A1 D1	Agry – gent- 0.0175 (g/70ml A.N)
2	A1 D2	Agry – gent- 0.0525 (g/70ml A.N)
3	A1 D3	Agry – gent- 0.0875 (g/70ml A.N)
4	A2 D1	Solarium- 0.14 (g/70ml A.N)
5	A2 D2	Solarium - 0.175 (g/70ml A.N)
6	A2 D3	Solarium- 0.21 (g/70ml A.N)
7	A3 D1	Bostok - 140 (ul/70ml A.N)
8	A3 D2	Bostok - 175 (ul/70ml A.N)
9	A3 D3	Bostok - 210 (ul/70ml A.N)
10	A4 D1	Enrofloxacin - 18 (ul/70ml A.N)
11	A4 D2	Enrofloxacin - 35 (ul/70ml A.N)
12	A4 D3	Enrofloxacin - 53 (ul/70ml A.N)
13	A5 D1	Oxitetraciclina - 4 (ul/70ml A.N)
14	A5 D2	Oxitetraciclina - 6 (ul/70ml A.N)
15	A5 D3	Oxitetraciclina - 8 (ul/70ml A.N)

### Campo

En Fase de campo se utilizaron los dos mejores antibióticos, los cuales fueron Agry-gent y Bostok, seleccionados previamente en control *in vitro*: A1, A2

**Cuadro 3.4:** Tratamientos en campo invernadero

No TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
T1	Agry-gent – 1.25 (g/l)
T2	Bostok – 3 (cc/l)
T3	Testigo (solo extirpación)

#### **3.3.1.3. Tipo de diseño**

El tipo de diseño que se utilizó fue completamente al azar, ya que la asignación de los tratamientos se dio en forma completamente aleatoria a las unidades experimentales en fase de laboratorio, mientras que en fase de campo se utilizó bloques completamente al azar.

#### **3.3.1.4. Características de las UE**

La unidad experimental para la fase de laboratorio estuvo constituido por una caja Petri.

Mientras que para la fase de campo, en el invernadero, estuvo constituida por diez plantas infectadas.

### 3.3.1.5. Croquis del diseño

T1 R1	T2 R1	T3 R1	T1 R2	
T2 R2	T3 R2	T1 R3	T2 R3	T3 R3
T1 R4	T2 R4			
T3R4				
T1 R5	T2 R5			
T3 R5				

<b>TRATAMIENTOS</b>			
<b>ANTIBIÓTICOS</b>	T1:Agry- gent (g/l)	T2:Bostok (cc/l)	T3:Extirpación sin antibiótico
<b>DOSIS</b>	1,25	3	0

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 LABORATORIO

#### 4.1.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (ufc) DE *Agrobacterium tumefaciens* A LAS 24, 48, 72 Y 144 HORAS, EN EL CONTROL *IN VITRO*.

Al establecer el análisis de varianza para los datos obtenidos en la evaluación realizada a las 24 horas, no se encontró diferencias estadísticas para los tratamientos, así como en cada una de las fuentes de variación establecidas; mientras, que a partir de las 48, 72 y 144 horas, los tratamientos se diferenciaron a nivel del 1%, así como entre los grupos en estudio que corresponden a los antibióticos, A las 48 horas no se encontró diferencias entre las dosis de Agry-gent, mientras que a 72 y 144 horas se diferenciaron a nivel del 1% manifestando al mismo nivel un efecto lineal y cuadrático; las dosis de Solarium se diferenciaron a nivel del 5% a las 48 y 72 horas, manifestando un efecto lineal al mismo nivel a las 48 horas y un efecto cuadrático a nivel del 1% a las 72 horas; Dentro del antibiótico Bostok se encontró diferencias estadísticas entre sus dosis a nivel del 5%, a las 144 horas, presentando un efecto lineal a las 72 horas al 5% y al 1% a las 144 horas; Los productos Enrofloxacina y Oxitetraciclina únicamente presentaron diferencias estadísticas a nivel del 5 y 1% respectivamente, manifestando un efecto cuadrático al 1% entre los niveles (Cuadro 4.1).

Los promedios generales del número de unidades formadoras de colonias (ufc's) de *Agrobacterium tumefaciens in vitro* fueron de 0.576, 1.334, 34.89 y 40.734 para las evaluaciones realizadas a las 24, 48, 72 y 144 horas, después de la aplicación, con coeficientes de variación de 24.27, 24.02, 31.21 y 29.41% respectivamente.

**Cuadro 4.1: Análisis de varianza para las ufc's de *Agrobacterium tumefaciens in vitro* a las 24, 48, 72 y 144 horas bajo el efecto de 5 antibióticos a tres dosis. IASA, Rumiñahui, Pichincha 2011**

Fuentes de variación	G.L.	EVALUACIONES DE LAS ufc's			
		24 horas	48 horas	72 horas	144 horas
TOTAL	47				
TRATAMIENTOS	15	0.09 ns	0.61 **	29.05 **	30.92 **
GRUPOS	(5)	0.16 ns	0.94 **	25.50 **	30.45 **
DG1 (Agry-gent)	2	0.02 ns	0.12 ns	131.54 **	131.54 **
D Lineal	1	0.03 ns	0.11ns	203.77 **	203.77**
D Cuadrática	1	0.01 ns	0.12 ns	59.31**	59.31 **
DG2 (Solarium)	2	0.06 ns	0.54 *	10.15 *	7.31 ns
D Lineal	1	0.09ns	0.94 *	0.60 ns	0.11 ns
D Cuadratica	1	0.03ns	0.13 ns	19.71 **	14.51 ns
DG 3 (Bostok)	2	0.00 ns	0.08 ns	6.005 ns	10.635 *
D Lineal	1	0.00 ns	0.11 ns	11.90 *	21.26 **
D Cuadratica	1	0.00 ns	0.04 ns	0.09 ns	0.01 ns
DG 4 (Enrofloxacina)	2	0.16 ns	0.58 *	2.87 ns	3.85 ns
D Lineal	1	0.17 ns	0.01ns	0.14 ns	3.40 ns
D cuadrática	1	0.15 ns	1.15 **	5.61 ns	4.29 ns
DG 5 (Oxitetraciclina)	2	0.05 ns	1.06 **	1.79 ns	2.24 ns
D Lineal	1	0.02ns	0.70 ns	3.58 ns	4.04 ns
D cuadrática	1	0.08ns	1.42 *	0.00 ns	0.43 ns
ERROR	32	0.08	0.12	2.46	2.63
X( ufc)		0.576	1.334	34.89	40.734
CV(%)		24.27	24.02	31.21	29.41

El antibiótico más eficiente fue Bostok, pues a lo largo de cada una de las evaluaciones *in vitro* establecidas a las 24, 48, 72 y 144 horas presentaron el menor promedio de ufc's, por lo tanto ocuparon el primer lugar dentro del primer rango. El antibiótico Oxitetraciclina, presentó un promedio intermedio de ufc's, mientras que el resto fueron menos eficientes por presentar ufc's superiores (Cuadro 4.2).

**Cuadro 4.2: Efecto de los antibióticos sobre las ufc's de *Agrobacterium tumefaciens in vitro* en las evaluaciones establecidas a las 24,48,72 y 144 horas.**

PRODUCTOS	EVALUACIONES			
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS	144 HORAS
<b>P1</b> AGRY-GENT	0.22 ab	0.56 a	53.56 ab	53.56 ab
<b>P2</b> SOLARIUM	0.22 ab	0.89 a	57.11 b	61.78 b
<b>P3</b> BOSTOK	0.00 a	0.22 a	9.22 a	13.33 a
<b>P4</b> ENROFLOXACINA	0.89 b	2.44 b	37.56 ab	53.78 b
<b>P5</b> OXITETRACICLINA	0.67 ab	2.56 b	17.00 ab	21.22 ab

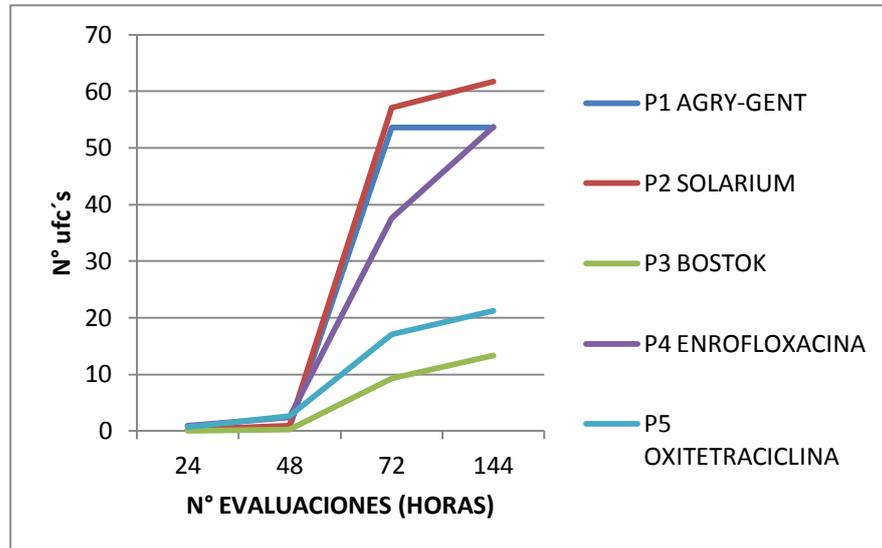
De la información anterior se desprende que el Bostok fue más eficiente debido a que tiene dentro de sus componentes a la Oxitetraciclina HCL (100 g/l), Tiazoles (370 g/l) e ingredientes inertes (530 g/l) como principio activo, por otro lado controla bacterias gran negativas y actúa a nivel de la plásmida energética de la bacteria inhibiendo la biosíntesis de proteínas

(<http://www.asopran.org/images/tecnicas/bostok.pdf>).

Por otro lado no se tomó en cuenta a la Oxitetraciclina debido que el antibiótico Agry-gent dentro de su principio activo tiene Sulfato de Gentamicina (100 g/Kg.) más Clorhidrato de Oxitetraciclina (300 g/Kg.) y se quiso ver el resultado de la combinación del Sulfato de Gentamicina y Clorhidrato de Oxitetraciclina en un mismo antibiótico en campo (Vademecum, 1999).

En forma objetiva se aprecia en el gráfico 4.1 la eficacia del antibiótico Bostok, pues en cada una de las evaluaciones presentó el menor promedio de las unidades formadoras de colonias de *Agrobacterium tumefaciens in vitro*, además, se aprecia que la mayor población de las unidades formadoras de colonias (ufc's) se presentó a partir de las 48 horas, las mayores poblaciones se exhibieron con los antibióticos

Solarium, Agry-gent y Enrofloxacin, comportándose por lo tanto como menos eficientes.



**Gráfico 4.1: Efecto de los antibióticos sobre las unidades formadoras de colonias de *Agrobacterium tumefaciens* in vitro en las evaluaciones a las 24, 48, 72 y 144 horas**

En términos generales al evaluar todos los tratamientos se observó que a medida que se incrementaban las dosis de cada uno de los antibióticos decrecieron las unidades formadoras de colonias, manifestándose más eficientes los antibióticos Agry-gent y Bostok, el primero en la dosis más alta no permitió la presencia de ninguna unidad formadora de colonias en cada una de las evaluaciones establecidas, mientras que el segundo apenas apareció una unidad formadora de colonias a las 72 y 144 horas y por lo tanto ocuparon el primer rango mediante la prueba de Duncan al 5%. El tratamiento menos eficiente constituyó el Agry-gent en su dosis más baja (Cuadro 4.3).

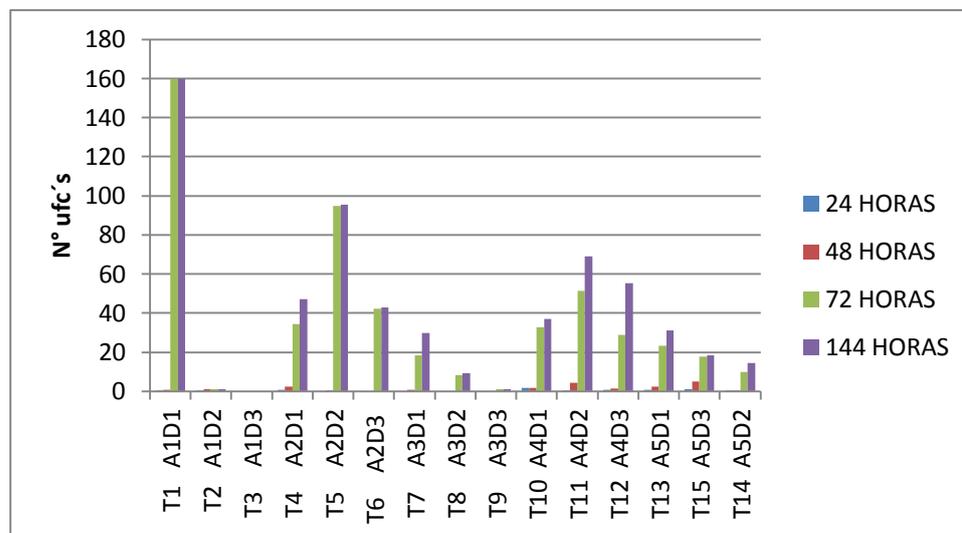
**Cuadro 4.3: Efecto de los tratamientos sobre las ufc's de *Agrobacterium tumefaciens in vitro* en las evaluaciones establecidas a las 24, 48, 72 y 144 horas.**

TRATAMIENTOS	EVALUACIONES			
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS	144 HORAS
T1 A1D1	0.33 ab	0.67 abc	159.67 g	159.67 g
T2 A1D2	0.33 ab	1.00 abc	1.00 ab	1.00 ab
T3 A1D3	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
T4 A2D1	0.67 ab	2.33 bcd	34.33 cde	47.00 def
T5 A2D2	0.00 a	0.33 ab	94.67 f	95.33 f
T6 A2D3	0.00 a	0.00 a	42.33 de	43.00 def
T7 A3D1	0.00 a	0.67 abc	18.33 bcde	29.67 cde
T8 A3D2	0.00 a	0.00 a	8.33 abc	9.33 abc
T9 A3D3	0.00 a	0.00 a	1.00 ab	1.00 ab
T10 A4D1	1.67 b	1.67 abc	32.67 cde	37.00 cde
T11 A4D2	0.33 ab	4.33 d	51.33 ef	69.00 ef
T12 A4D3	0.67 ab	1.33 abc	28.67 cde	55.33 ef
T13 A5D1	0.67 ab	2.33 cd	23.33 cde	31.00 cde
T14 A5D2	1.00 ab	5.00 d	17.67 bcd	18.33bcd
T15 A5D3	0.33 ab	0.33 ab	10.00 abc	14.33 abcd

En el grafico 4.2 se puede apreciar claramente la eficiencia que presentaron los tratamientos T3 y T9 que corresponden a las dosis altas de los antibióticos Agry-gent y Bostok respectivamente para el control de *Agrobacterium tumefaciens in vitro*, anotando además que el tratamiento menos eficiente fue el T1 que corresponde a la dosis más baja del antibiótico Agry-gent.

De la información anterior las dosis altas de los antibióticos son las dosis curativas recomendadas de los mismos en campo, teniendo que la dosis curativa de Agry-gent es 150 g/200 litros agua y de Bostok es 1.5 – 2.5 cc/l (Vademecum, 1999).

Hay que señalar que las dosis para el control *in vitro* se basaron en las dosis recomendadas transformándolas para la cantidad de medio de Agar nutritivo que utilizamos.



**Gráfico 4.2: Efecto de los tratamientos en base de antibióticos sobre la ufc's de *Agrobacterium tumefaciens* in vitro en las evaluaciones establecidas a las 24, 48, 72 y 144 horas.**

#### 4.1.2 REGRESIONES Y COEFICIENTES DE DETERMINACION

En el Anexo 1 se presentan las regresiones y coeficientes de determinación entre las dosis de cada uno de los antibióticos con sus respectivas ufc's, en donde se puede apreciar claramente que las mayores relaciones entre las dosis con las ufc's se presentaron en los antibióticos Bostok que a las 48, 72 y 144 horas mostraron coeficientes de determinación de 0.75, 0.99 y 0.94 respectivamente, seguido de la Oxitetraciclina que a las 72, 144 horas presentaron coeficientes de determinación de 0.99 y 0.92 respectivamente.

## 4.2 CAMPO

### 4.2.1 TAMAÑO DE TUMORES

Al establecer el análisis de varianza para el tamaño de los tumores en las evaluaciones establecidas inicial y a los 15 días, no se encontró diferencias estadísticas para repeticiones ni tratamientos, mientras que a los 30 días las repeticiones se diferenciaron al nivel del 1% y los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas (Cuadro 4.4).

Los promedios generales del tamaño de los tumores fueron de 1.80, 0.00 y 1.26 cm en las evaluaciones inicial, 15 y 30 días, respectivamente, con coeficientes de variación de 43.42%, 0.00% y 56.96%.

**Cuadro 4.4: Análisis de varianza para las evaluaciones del tamaño de tumores de *Agrobacterium tumefaciens* en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días. IASA. Rumiñahui. Pichincha 2011**

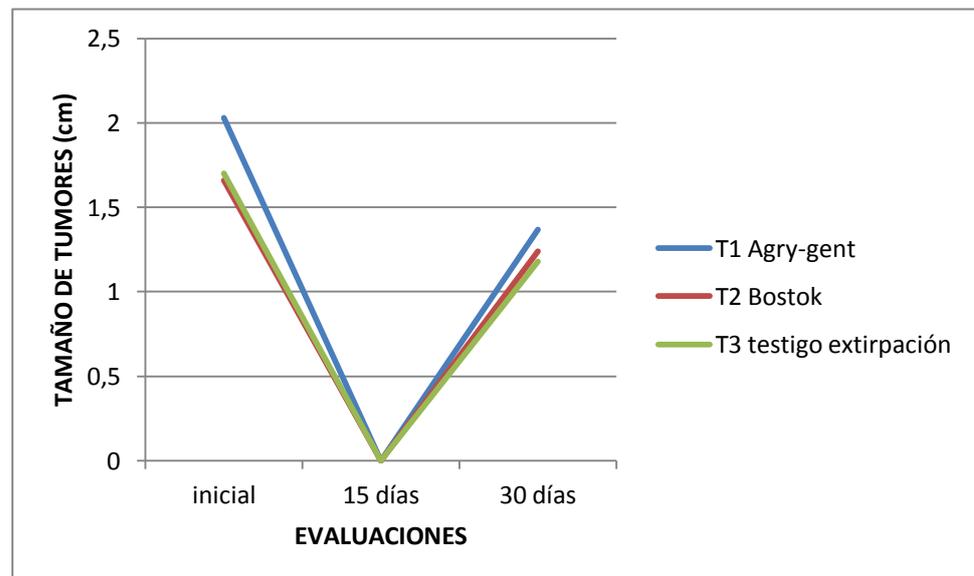
Fuentes de variación	G.L.	EVALUACIÓN DE TAMAÑO TUMORES (cm)		
		Evaluación inicial	15 días	30 días
<b>TOTAL</b>	14			
<b>REPETICIONES</b>	4	1.32 ns	0.00 ns	5,22 **
<b>TRATAMIENTOS</b>	2	0.21 ns	0.00 ns	0.05 ns
<b>ERROR</b>	8	0.61	0.00	0.52
<b>X (cm)</b>		1.80	0.00	1.26
<b>CV (%)</b>		43.42	0.00	56.96

Prácticamente no hubo ningún efecto de los tratamientos en estudio de acuerdo a los datos generados particularmente si se analizan los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas a los 30 días, no obstante, hay que resaltar que los datos de la evaluación inicial se refiere al tamaño de agallas, detectados al inicio de la investigación y antes de su extirpación.

Como es lógico a los 15 días no se detectó presencia de tumores, debido que estos fueron previamente eliminados (Cuadro 4.5 y Gráfico 4.4).

**Cuadro 4.5: Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de los tumores de *Agrobacterium tumefaciens* en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, y 30 días.**

TRATAMIENTOS	TAMAÑO DE TUMORES (cm)		
	Evaluación inicial	15 días	30 días
T1 Agry-gent	2.03	0.00	1.37
T2 Bostok	1.66	0.00	1.24
T3 Testigo extirpación	1.70	0.00	1.18



**Gráfico 4.3: Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de los tumores de *Agrobacterium tumefaciens* en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30 días.**

De los resultados anteriores se desprende que para el tamaño de los tumores no se presento un efecto de los antibióticos pues presentaron tamaños similares que el testigo

#### 4.2.2 PORCENTAJE DE REGENERACIÓN DE TUMORES

Los análisis de varianza para el porcentaje de regeneración de los tumores en las evaluaciones establecidas a los 15, 30 y 45 días no establecieron diferencias estadísticas para repeticiones y tratamientos en las dos primeras evaluaciones, mientras que a los 45 días las repeticiones se diferenciaron al nivel del 5% y los tratamientos al nivel del 1% (Cuadro 4.6).

Prácticamente los promedios generales del porcentaje de regeneración fueron cero en las evaluaciones realizadas a los 15 y 30 días mientras que a los 45 días alcanzó un promedio de 20.67%. Lógicamente los coeficientes de variación frente a la ausencia total de regeneración fue cero a los 15 y 30 días mientras que a los 45 días alcanzo un porcentaje de 50.75% debido a la gran variabilidad.

**Cuadro 4.6: Análisis de varianza para las evaluaciones de los % de regeneración de tumores de *Agrobacterium tumefaciens* en en cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días. IASA. Rumiñahui. Pichincha 2011**

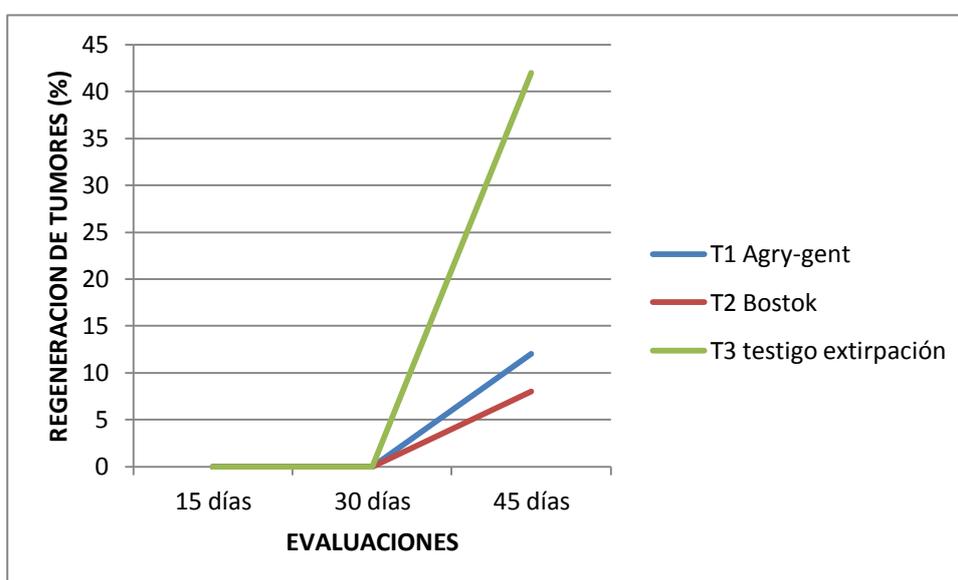
Fuentes de variación	G.L.	EVALUACIÓN DE LAS REGENERACIONES (%)		
		15 días	30 días	45 días
<b>TOTAL</b>	14			
<b>REPETICIONES</b>	4	0.00 ns	0.00 ns	540.00 *
<b>TRATAMIENTOS</b>	2	0,00 ns	0.00 ns	1726,67 **
<b>ERROR</b>	8	0.00	0.00	110.00
<b>X (%)</b>		0.00	0.00	20.67
<b>CV (%)</b>		0.00	0.00	50.75

El mayor porcentaje de regeneración de los tumores o agallas a los 45 días, se presentó con el testigo, debido a que únicamente se estableció la labor de extirpación, el menor porcentaje de regeneración se manifestó en las plantas tratadas con Bostok alcanzando un promedio de 8% sin diferenciarse estadísticamente del producto Agrygent., En las plantas testigo en las cuales no se aplicaron antibióticos se observó un mayor porcentaje de regeneración de los tumores de *Agrobacterium tumefaciens*

diferenciándose estadísticamente mediante la prueba de Duncan al 5% de los antibióticos (Cuadro 4.7 y Grafico 4.5).

**Cuadro 4.7: Efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de regeneración de los tumores de *Agrobacterium tumefaciens* en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.**

TRATAMIENTOS	REGENERACIÓN DE TUMORES (%)		
	15 días	30 días	45 días
T1 Agry-gent	0.00	0.00	12.00 a
T2 Bostok	0.00	0.00	8.00 a
T3 Testigo extirpación	0.00	0.00	42.00 b



**Gráfico 4.4: Efecto de los tratamientos sobre el %regeneración de los tumores de *Agrobacterium tumefaciens* en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.**

### 4.2.3 TAMAÑO DE BROTES

Los análisis de varianza para la calidad de brotes en rosa en las tres evaluaciones establecidas, no detectó diferencias estadísticas para repeticiones y tratamientos en cada una de ellas (Cuadro 4.8).

Los promedios generales de los tamaños de los brotes fueron incrementándose de 1.25 cm en la primera evaluación hasta alcanzar los 41.08 cm en la tercera y última evaluación, con coeficiente de variación entre 14.80 a 34.14%

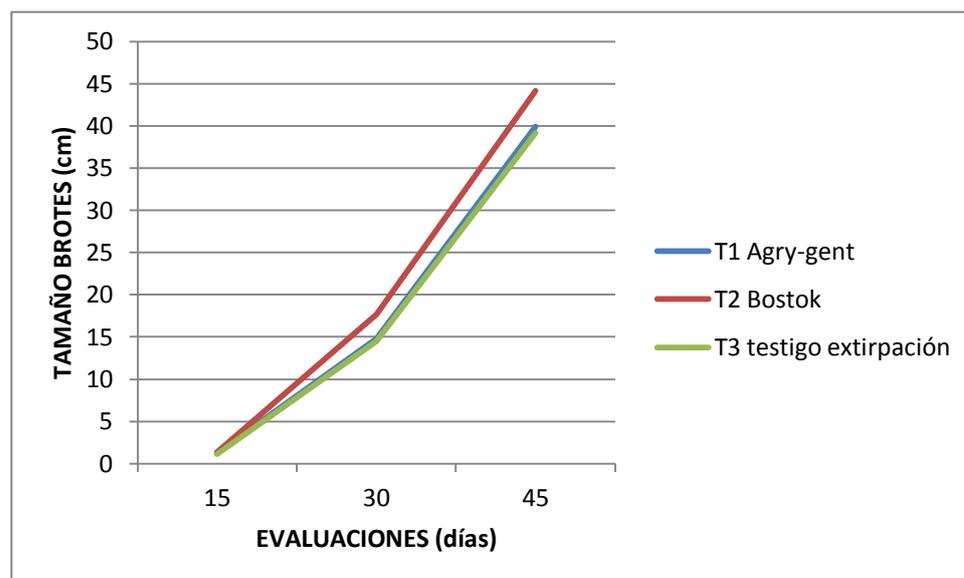
**Cuadro 4.8: Análisis de varianza para el tamaño de brotes en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días. IASA. Rumiñahui. Pichincha 2011**

Fuentes de variación	G.L.	EVALUACIÓN DE TAMAÑO DE BROTES (cm)		
		15 días	30 días	45 días
<b>TOTAL</b>	14			
<b>REPETICIONES</b>	4	0.31 ns	3.20 ns	35.24 ns
<b>TRATAMIENTOS</b>	2	0.04 ns	15.15 ns	36.54 ns
<b>ERROR</b>	8	0.18	9.90	36.99
<b>X (cm)</b>		1.25	15.66	41.08
<b>CV (%)</b>		34.14	20.09	14.80

Sin embargo de no diferenciarse estadísticamente un ligero mayor crecimiento de brotes se presentó al aplicar el Bostok pues estos brotes manifestaron una mayor longitud, mientras que el Agry-gent y el testigo presentaron similares promedios especialmente en la segunda y tercera evaluación (Cuadro 4.9 y Grafico 4.5).

**Cuadro 4.9: Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de brotes en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.**

TRATAMIENTOS	TAMAÑO DE BROTES (cm)		
	15 días	30 días	45 días
<b>T1</b> Agry-gent	1.27	14.82	39.92
<b>T2</b> Bostok	1.32	17.66	44.17
<b>T3</b> Testigo extirpación	1.15	14.50	39.16



**Gráfico 4.5:** Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de brotes en el cultivo de rosas variedad Wow a los 15, 30, 45 días.

#### 4.2.4 LONGITUD DE TALLOS EN EL CULTIVO DE ROSA VARIEDAD WOW

El análisis de varianza para la longitud de tallos en el cultivo de rosa variedad Wow no estableció diferencias estadísticas para repeticiones y tratamientos (Cuadro 4.10).

El promedio general de la longitud del tallo fue de 35.86 cm con su coeficiente de variación de 10.84%

**Cuadro 4.10:** Análisis de varianza para la longitud de tallos en el cultivo de rosas variedad Wow. IASA. Rumiñahui. Pichincha 2011

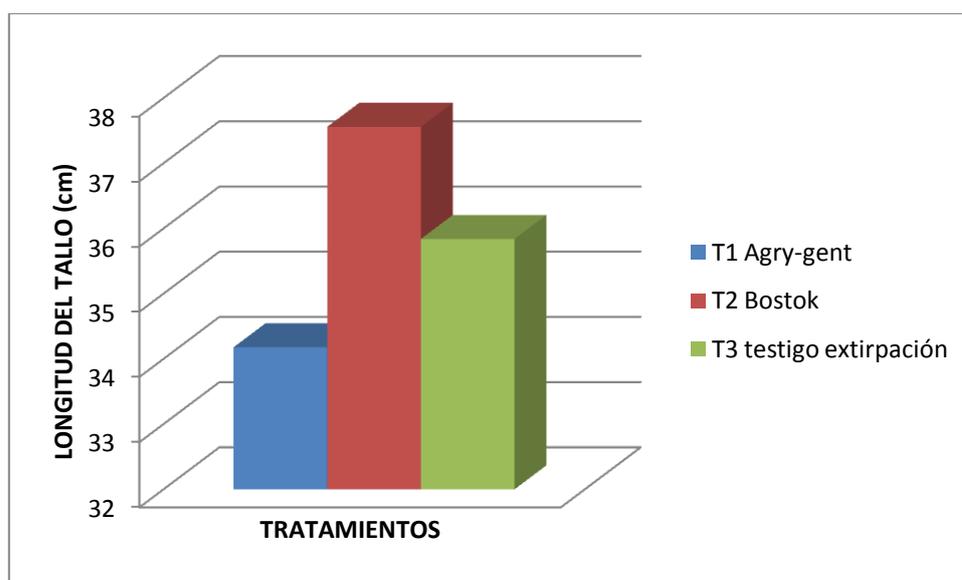
Fuentes de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
<b>TOTAL</b>	14	162.53		
<b>REPETICIONES</b>	4	13.20	3.30	0.22 ns
<b>TRATAMIENTOS</b>	2	28.56	14.28	0.95 ns
<b>ERROR</b>	8	120.76	15.10	
<b>X (cm)</b>			35.86	
<b>CV (%)</b>			10.84	

Sin embargo de no diferenciarse estadísticamente los tratamientos, bajo la aplicación del antibiótico Bostok se presentó la mayor longitud de tallo con un promedio de 37.56 cm mientras que el resto de tratamientos presentaron longitudes inferiores a 35.85 cm (Cuadro 4.11).

Los resultados anteriores coinciden con la longitud del brote y es así que a mayor longitud del brote mayor longitud del tallo.

**Cuadro 4.11: Efecto de los tratamientos sobre la longitud de tallos en el cultivo de rosas variedad Wow.**

TRATAMIENTOS	LONGITUD DE TALLO (cm)
T1 Agry-gent	34.18
T2 Bostok	37.56
T3 Testigo extirpación	35.84



**Gráfico 4.6: Efecto de los tratamientos sobre la longitud de tallos en el cultivo de rosas variedad Wow.**

#### 4.2.5 TAMAÑO DE BOTÓN EN EL CULTIVO DE ROSA VARIEDAD WOW

El análisis de varianza para el tamaño de botón en el cultivo de rosa variedad Wow, no exhibió se encontró diferencias estadísticas para repeticiones y tratamientos (Cuadro 4.12).

El promedio general del tamaño de botón fue de 4.54 cm, con un coeficiente de variación de 16.37%.

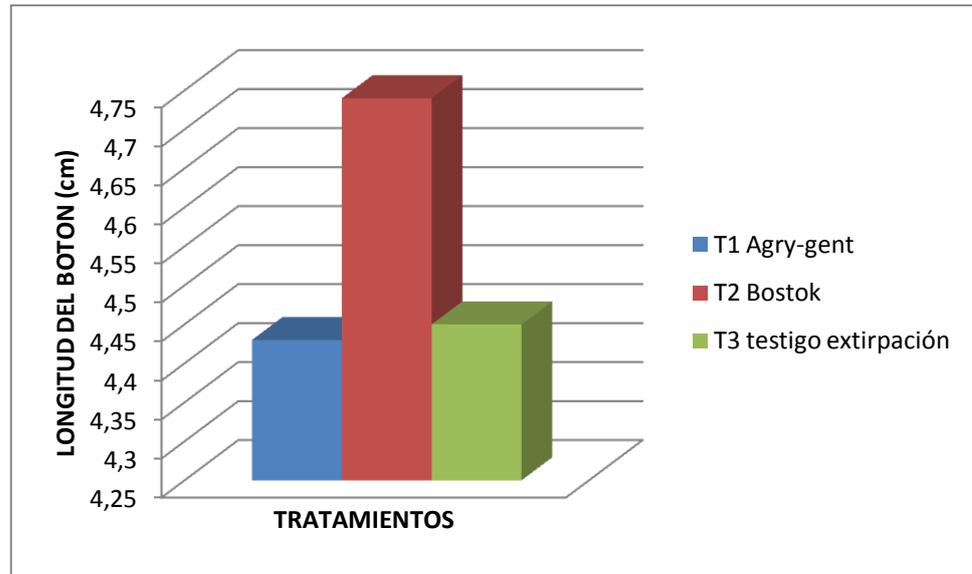
**Cuadro 4.12: Análisis de varianza para el tamaño de botón en el cultivo rosas variedad Wow. IASA. Rumiñahui. Pichincha 2011**

Fuentes de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
<b>TOTAL</b>	14	5.39		
<b>REPETICIONES</b>	4	0.68	0.17	0.31 ns
<b>TRATAMIENTOS</b>	2	0.30	0.15	0.27 ns
<b>ERROR</b>	8	4.41	0.55	
<b>X (cm)</b>				4.54
<b>CV (%)</b>				16.37

Sin embargo de no diferenciarse estadísticamente bajo la aplicación del antibiótico Bostok presentó el mayor tamaño de botón con un promedio de 4.74 cm, mientras que el resto de tratamientos presentaron un tamaño de botón inferiores a 4.46 cm (Cuadro 4.13).

**Cuadro 4.13: Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de botón en el cultivo de rosas variedad Wow.**

TRATAMIENTOS	TAMAÑO DE BOTÓN (cm) (Longitud)
<b>T1</b> Agry-gent	4.43
<b>T2</b> Bostok	4.74
<b>T3</b> Testigo extirpación	4.45



**Gráfico 4.7: Efecto de los tratamientos sobre el tamaño de botón en el cultivo de rosas variedad Wow.**

### 4.3 ANÁLISIS ECONÓMICO

Siguiendo la metodología del análisis del presupuesto parcial según Perrin *et.al.* (1981) se procedió a obtener el beneficio bruto que corresponde al número de tallos por su precio en el mercado, por otro lado se obtuvieron los costos variables que corresponde al valor de los antibióticos, de la diferencia de los beneficios brutos menos los costos variables se obtuvo el beneficio neto (Cuadro 4.14).

**Cuadro 4.14: Beneficio bruto, costo variable y beneficio neto de los tratamientos en estudio**

TRATAMIENTOS	Beneficio bruto	Costo variable	Beneficio neto
<b>T1 AGRY-GENT</b>	17,5	3	14,5
<b>T2 BOSTOCK</b>	17,25	0,73	16,52
<b>T3 SOLO EXTIRPACIÓN</b>	15,25	0	15,25

Colocando los beneficios netos en orden decreciente acompañado de sus costos variables se procedió a realizar el análisis de dominancia, donde tratamiento

dominado es aquel que presenta un menor beneficio neto con mayor costo variable, de este análisis se determinó que los tratamientos T2 Bostok y T3 solo extirpación no fueron dominados (Cuadro 4.15).

**Cuadro 4.15: Análisis de dominancia de los tratamientos en estudio**

TRATAMIENTOS	Beneficio neto	Costo variable	T/D
<b>T2 BOSTOCK</b>	16,52	0,73	
<b>T3 SOLO EXTIRPACIÓN</b>	15,25	0	
<b>T1 AGRY-GENT</b>	14,5	3	*

\*Tratamiento no dominado

Con los tratamientos no dominados se procedió a realizar el análisis marginal determinando que la mejor opción económicamente es la aplicación del Bostok luego de haber realizado la extirpación, pues con un incremento de 0,73 dólares se obtuvo un beneficio neto de \$ 1,27 provocando una tasa interna de retorno marginal de \$ 1,74 lo que indica que por cada dólar invertido se obtiene un retorno de \$ 1,74 (Cuadro 4.16).

**Cuadro 4.16: Análisis marginal de los tratamientos no dominados**

TRATAMIENTOS	Beneficio neto	Costo variable	$\Delta$ Beneficio neto	$\Delta$ Costo variable	TIR M
<b>T2 BOSTOCK</b>	16,52	0,73	1,27	0,73	1,739
<b>T3 SOLO EXTIRPACIÓN</b>	15,25	0			

## V. CONCLUSIONES

### 5.1 LABORATORIO

El antibiótico más eficiente en el control *in-vitro* de *Agrobacterium tumefaciens*, fue Bostok, pues los promedios de la unidades formadoras de colonias fueron los más bajos en las evaluaciones, seguido del Agry - gent.

El tratamiento más eficiente en el control de *Agrobacterium tumefaciens* correspondió a la dosis alta de Agry-gent (T3: 0.0875 g/70ml A.N), por la ausencia total de esta bacteria, seguido de Bostok en la dosis alta (T9: 210 ul/70ml A.N) que presentó solo una colonia de esta bacteria.

La dosis baja de Agry-gent la cual correspondió a 0,0175 g/70ml A.N no funcionó en el control *in-vitro* de *Agrobacterium tumefaciens* pues presentó los mayores promedios de unidades formadoras de colonias.

### 5.2 CAMPO

Ningún tratamiento presentó evidencia de agallas ni a los 15 ni 30 días a la evaluación, sin embargo a los 45 días estos alcanzaron un crecimiento promedio de 1 cm, manifestando de esta manera un efecto reducido de los antibióticos sobre el tamaño de tumores.

El mayor porcentaje de regeneración de agallas le correspondió al testigo (solo extirpación) con un 42% de regeneración en plantas tratadas; consecuentemente los tratamientos con Agry-gent y Bostok limitaron el crecimiento con un porcentaje de regeneración de 12 y 8% respectivamente.

La aplicación del antibiótico Bostok a plantas, propició un mejor tamaño de brotes con una media de 44.17 cm, longitud de tallo de 37.56 cm y tamaño del botón de 4.74 cm, no obstante, no se diferenció estadísticamente del resto de tratamientos.

Económicamente la aplicación del antibiótico Bostok, fue el más eficiente por adquirir una adecuada tasa interna de retorno marginal de \$ 1,74, lo que indica que por cada dólar invertido se obtiene un retorno de \$ 1,74.

## VI. RECOMENDACIONES

Luego de la extirpación de la agalla de la corona, se pueden hacer tres aplicaciones tópicas de Bostok (3cc/l) o de Agry-gent (1,25 g/l) con un intervalo de 15-21 días entre ellos.

No se recomienda la ejecución de más de tres aplicaciones a fin de no generar estirpes resistentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se sugiere validar la utilización de este antibiótico en diferentes variedades de rosa en empresas florícolas que tengan este problema fitosanitario.

Se puede realizar diversas estrategias de control incluyendo solarización, vaporización, o la implementación de un control biológico con *Agrobacterium radiobacter* K84 o K 1026.

## VII. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de establecer la eficiencia de antibióticos, en el control de *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal de la agalla de la corona en *Rosa* sp. La investigación se llevó a cabo en dos fases: En la fase de Laboratorio en donde se comprobó *in vitro* la eficiencia de antibióticos en el control de *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el número de unidades formadoras de colonias (ufc) en caja Petri. Los antibióticos que permitieron el menor número de (ufc) fueron Agry-gent en una dosis de 0.0875 (g/70ml A.N) y Bostok en una dosis de 210 (ul/70ml A.N) que corresponden a las dosis curativas recomendadas de los antibióticos.

Por otro lado en la fase de campo (invernadero) se procedió a la extirpación de los tumores de las plantas marcadas previamente y se aplicaron tratamientos: (T1) Agry-gent a una dosis de 1,25 g/l, (T2) Bostok a una dosis de 3 cc/l obtenidos de la evaluación *in vitro* y T3 Testigo solo extirpación. En donde el mayor porcentaje de regeneración de agallas correspondió al testigo (solo extirpación) con un 42% de regeneración en plantas tratadas; consecuentemente los tratamientos con Agry-gent y Bostok limitaron el crecimiento con un porcentaje de regeneración de 12 y 8% respectivamente. Bajo la aplicación del antibiótico Bostok se logró un mejor tamaño de brotes con una media de 44.17 cm, longitud de tallo de 37.56 cm y tamaño del botón de 4.74 cm.

## VIII. ABSTRACT

The present study was realized in order to establish the efficiency of antibiotics, in the control of *Agrobacterium tumefaciens*, causal agent of the gall-nut of the crown in Rose sp. The investigation was carried out in two phases: In the laboratory phase where the efficiency of antibiotics was verified *in vitro* in the control of *Agrobacterium tumefaciens*, by means of the number of forming units of colonies (ufc) in box Petri. The antibiotics that allowed the minor number of (ufc) were Agry-gent in a dose of 0.0875 (g/70ml A.N) and Bostok in a dose of 210 (ul/70ml A.N) that correspond to the curative doses recommended of the antibiotics.

On the other hand in the field phase (greenhouse) one proceeded to the extirpation of the tumors of the plants marked before and treatments were applied: (T1) Agry-gent to a dose of 1,25 g/l, (T2) Bostok to a dose of 3 cc/l obtained of the *in vitro* evaluation and T3 alone Witness extirpation. Where the major percentage of regeneration of tonsils corresponded to the witness (alone extirpation) with 42 % of regeneration in treated plants; consistently the treatments with Agry-gent and Bostok bordered the growth on a percentage of regeneration of 12 and 8 % respectively. Under the application of the antibiotic Bostok a better size of outbreaks was achieved by an average of 44.17 cm, length of stem of 37.56 cm and size of the button of 4.74 cm

## IX. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. 2005. Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa. Eds. Grupo Noriega. México D. F. México. 838p.

APUNTES DE CÁTEDRA DE FLORICULTURA, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA. Sangolqui. 2008

CHILTON, M. D., DRUMMIND, M. H., MERIO, D. J., SCIAKY, D., MONTOYA, A. L., GORDON, M. P., NESTER, E. W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11: 263-267.

FALCONI, C. 1997. Fitopatología y Control de enfermedades Manual de laboratorio y Campo. ESPE-IASA. Quito. Ecuador. 119 p.

FERRER, M. Y PALOMO, S. 1986. La producción de rosas en cultivo protegido. Primera Edición, Editorial Universal Plantas. S.A. España. 382 p.

GALLEGOS, P.; MERINO, R.; ORELLANA, H.; PROAÑO, G.; SUQUILANDA, M.; VELASTEGUI, R.; ZURITA, G. 1999. Manual técnico de fitosanidad en floricultura. Quito. Ecuador. 150 p.

GORLENKO, M. W. 1961. Bacterial diseases of plants. Segunda Edición. Jerusalén. Monsón. Pp 19-21

GUERRERO, MANOSALVAS, R. 2002. Evaluación de 3 inhibidores de la agalla de la corona por (*Agrobacterium tumefaciens*) en rosa bajo invernadero. Tesis de Grado Ingeniero Agropacuaro. IASA. Sangolquí. Ecuador.

HORST, R.K. 1998. Compendio de enfermedades de .rosas. APS Press-Flor y Flor, Quito, Ec. 50p.

ISODORO, 2008. Plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. [En línea]. Blog de Isodoro. España. Consultado 29 Agosto de 2011. Disponible en: <http://isidoromarcam.blogspot.com/2008/01/plsmido-ti-de-agrobacterium-tumefaciens.html>

JOOS, H., INZÉ, D., CAPLAN, A., SORMANN, M., VAN MONTAGU, M., Schell, J. 1983. Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. Cell 32: 1057-1067.

Kerster, K. y De Ley, J. 1984. Genus III *Agrobacterium* Conn. 1942. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol I. Williams& Wilkins Co., Baltimore. pp 244-254.

M.C. LINARES, H. 2004. El Cultivo del Rosal. [En línea]. Manual del participante. México, Secretaria de la reforma agraria. Consultado 3 Noviembre de 2010. Disponible en:

[http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tierras/manuales/Cultivo\\_rosal.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Cultivo_rosal.pdf)

© Monografias.com S.A. Antibióticos. [En línea]. © Monografias.com S.A. Consultado 30 Octubre de 2010. Disponible en: (<http://www.monografias.com/trabajos5/antibio/antibio.shtml#intro59>)

NAVARRETE, X. 1994. Caracterización, control químico y biológico del Agente causal de “La agalla de la corona”. Tesis de Grado Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía Universidad Central del Ecuador. Quito.Ecuador. 138 p.

NEOQUIM. CIA.LTDA.2010. Bostok Fungicida Bactericida Sistémico. [En línea]. Copyright © 2005 - 2010 Asociación de Productores Agropecuarios del Norte. Consultado 15 Noviembre de 2010. Disponible en: <http://www.asopran.org/images/tecnicas/bostok.pdf>

OLEAS, A; PADILLA, F; TACO, M. Bacteriosis del tomate riñón cultivado bajo invernadero. Sangolqui. Ecuador. 2009

PÉREZ, P.Ll. 2003. Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens*. [En línea]. Tesis Doctoral. Valencia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Consultado 28 Agosto de 2011. Disponible en:

<http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/9564/LLOP.pdf?sequence=1>

QUINATO, I. 2009. Análisis del Comportamiento de cepas Bacterianas Patogénicas de Tomate Riñón (*Lycopersicon esculentum* Mil), Frente a productos Bactericidas. Tesis de Grado Ingeniero Agropacuario. IASA. Sangolquí. Ecuador.

SARASOLA, A.a. y SARASOLA, R.m. 1975. Fitopatología. Bacteriosis y Virosis. Buenos Aires. pp 4-15.

VADEMÉCUM FLORICOLA. 1999. Series Mini – Vademécum florícola. Edifarm. División de Publicaciones Técnicas. Imprenta Nación. Quito. Ecuador. P 305, 425, 606.

VELASTEGUI, R. (1999). Porcentaje de presencia de enfermedades en floricultoras del estudio. In: GALLEGOS, P. *et al.* Manual técnico de fitosanidad en floricultura. Quito. Ecuador. 150 p.

© 2010 [www.ecuaquimica.com](http://www.ecuaquimica.com). **Baytril ® 5%**. [En línea]. Desarrollado

por: [Erodata S.A.](#) Consultado 15 Noviembre de 2010. Disponible en:

[http://www.ecuaquimica.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=286&catid=42&sectid=11](http://www.ecuaquimica.com/index.php?option=com_content&task=view&id=286&catid=42&sectid=11)