

EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTES EN LA ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS *IN VITRO* COMO ALTERNATIVA NUTRICIONAL

Claudia Y. Camacho^{1*}, Rosa Mary Hernández¹ e Iselen E. Trujillo²

¹Laboratorio de Biogeoquímica y ²Laboratorio de Biotecnología Agrícola,
Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Instituto de Estudios
Científicos y Tecnológicos (IDECYT). *claudiac621@hotmail.com

RESUMEN

Los biofertilizantes han surgido como alternativa en la fase de aclimatación en la propagación *in vitro* de plántulas. La piña (*Ananas comosus*), es una fruta de aceptación en Venezuela, para consumo directo, farmacológico, y materia prima para la industria. Su propagación vegetativa presenta bajo porcentaje de multiplicación, siendo la propagación *in vitro* una alternativa para incrementar aceleradamente el número de plantas disponibles. En la propagación *in vitro* su punto más crítico es la fase de aclimatación, puesto que pasa de un medio controlado a uno no controlado; son muchos los factores a considerar en esta fase, entre ellos el sustrato factor primordial, ya que las asociaciones biológicas del mismo incidirán de forma determinante en el estado nutricional de la planta. El objetivo de la investigación fue evaluar diferentes abonos orgánicos locales en la aclimatación de vitroplantas de piña, mediante parámetros morfológicos. La metodología empleada se fundamentó en ocho tratamientos, se emplearon diferentes mezclas de biofertilizantes (compost, vermicompost) con diferentes porcentajes (25, 50, 75, 100) de mezcla con tierra abonada, la cual se utilizó como testigo. Se empleó un modelo de bloques aleatorios completamente al azar, evaluando los siguientes parámetros: número de hojas, tamaño de la planta y supervivencia de la planta. Los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos con mayor porcentaje de compost (50% y 75%) y vermicompost, (100%), para la altura de las plántulas y 75% compost para el número de hojas. Los resultados indican que el uso de biofertilizantes favorece la sobrevivencia y crecimiento de las plántulas en la fase de aclimatación.

Palabras clave: biofertilizantes, sustrato, aclimatación, vitroplantas.

Evaluation of biofertilizers for *in vitro* seedling acclimatation as a nutritional alternative

ABSTRACT

Biofertilizers have emerged as an alternative in the acclimatization phase in vitro propagation of seedlings. Pineapple (*Ananas comosus*) is an accepted perennial tropical fruit in Venezuela, for direct consumption, pharmacological, and raw material for the industry. Its vegetative propagation presents a low multiplication percentage, with *in vitro* propagation being an alternative to rapidly increase the number of available plants. In *in vitro* propagation, its most critical point is the acclimatization phase, since it goes from a controlled environment to an uncontrolled one; there are many factors to consider in this phase, among them the substrate is the primary factor, since its biological associations will have a decisive impact on the nutritional status of the plant. The objective of the research was to evaluate different local organic fertilizers in the acclimatization of pineapple vitroplants, using morphological parameters. The methodology used was based on eight treatments, different mixtures of biofertilizers (compost, vermicompost) were used with different percentages (25, 50, 75, 100) of mixture with fertilized soil, which was used as a control. A completely randomized block model was used, evaluating the following parameters: number of leaves, plan size and plant survival. The best results were obtained in the treatments with the highest percentage of compost (50% and 75%) and vermicompost (100%) for the height of the seedling, and 75% compost for the number of leaves. The results indicate that the use of biofertilizers favors the survival and growth of seedlings in the acclimatization phase.

Keywords: biofertilizers, substrate, acclimatization, vitroplants.

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus*), es una Bromeliaceae, la cual se propaga vegetativamente, presentando un porcentaje de multiplicación muy lento, siendo la propagación *in vitro* una alternativa para incrementar aceleradamente el número de plantas disponibles. En la actualidad la piña ha adquirido gran importancia comercial a nivel mundial por la demanda de su fruto; siendo un fruto de aceptación en Venezuela, para consumo directo, farmacológico, y materia prima para la industria, esta última en el caso de la Var. Valera amarilla (Castañeda, 2003).

La fertilización química ha generado gran impacto al ambiente, ya que su uso excesivo e irracional ha provocado daños irreversibles en muchos casos, de allí la importancia de generar conocimiento sobre una agricultura ecológica más armoniosa con el ambiente y alternativas de fertilización, donde el uso de compost con agregados locales puede ser una de ellas. En la propagación *in vitro* su punto más crítico es la fase de aclimatación, esta es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Astaiza, 2002). Con el auge de la agricultura sostenible el uso de biofertilizantes cobra cada vez mayor importancia donde no escapa la aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro*, es la fase crítica pues estas pasan de un medio en condiciones controladas a un medio no controlado, con características similares a la realidad existente en campo. Hay muchos factores a considerar en esta fase, siendo el sustrato un factor primordial, donde las asociaciones biológicas del mismo, incidirán de forma determinante en el estado nutricional de la planta, y su interacción con el ambiente (Ramírez y col., 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) merr), fueron obtenidas por el laboratorio de Biotecnología Agrícola del Centro de Estudios para el Desarrollo Agroecológico Tropical (CEDAT) del Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT), de la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR), conservadas en el cuarto de cultivo en el medio MS modificado por Linsmaier y Skoog (1965), suplementados con sacarosa (30g/l), vitaminas de Morell (10mg/l), BA (0,5 mg/l), agar (8g/l); de las cuales se seleccionaron las vitroplantas para aclimatar, mantenidas en condiciones de luz fluorescente continua y con intensidad lumínica $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$, con un fotoperiodo de 16 horas bajo luz blanca y 8 horas de oscuridad, y temperatura $22\pm 1^\circ\text{C}$. Se realizó una previa selección con una longitud superior a 3cm, y con número de hojas igual o superior a ocho (8) por vitroplanta, y con presencia de raíces. Se retiraron de los frascos y se lavaron con agua de chorro abundante para eliminar el agar y posterior se le hizo un lavado a profundidad con agua destilada.

Sustrato. El material utilizado como sustrato (tierra abonada), se obtuvo de un vivero comercial de la zona, mientras que el (compost y vermicompost) que se utilizó en aclimatación es proveniente de las zonas de estudio, Laguneta de la Montaña, Miranda, Venezuela. A los tres sustratos se le realizaron pruebas de humedad, posteriormente se esterilizo en autoclave a 120°C, 1.5 libras de presión, seguidamente fue a la estufa a 70°C y finalmente se extendió en bandejas para airear y bajar la temperatura. La metodología empleada se fundamentó en ocho tratamientos, donde se emplearon diferentes mezclas de biofertilizantes (compost, vermicompost) con diferentes porcentajes (25, 50, 75,100) con tierra abonada la cual se utilizó como testigo (Tabla 1).

Diseño experimental. El diseño experimental del ensayo correspondió a un modelo de bloques aleatorios completamente al azar, con 15 repeticiones por tratamiento para un total de 135 vitroplantas.

Variables analizadas. Para analizar la influencia a diferentes concentraciones de los biofertilizantes sobre las plántulas, se evaluaron los siguientes parámetros morfológicos: número de hojas, tamaño de la planta y sobrevivencia de la planta, en condiciones de fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad, durante 30 días estuvieron en bandejas de cartón (cartones para almacenaje de huevos) con un riego de 12 ml por plántula (capacidad de campo). Posteriormente, fueron sacadas del laboratorio al vivero en vasos plásticos, con un riego de 20 ml por plántula 3 veces por semana, manteniendo las concentraciones establecidas. Dichas plántulas se evaluaron por 90 días, donde se determinó el crecimiento de las mismas, mediante el cálculo de cada una de las variables, según la siguiente ecuación: % de incremento= $V2-V1/V1*100$.

Metodología analítica. Para evaluar la respuesta de los diferentes tratamientos a diferentes concentraciones a las vitroplantulas, se realizó determinaciones de forma simultánea tanto a la biomasa vegetal como a los sustratos determinando en ambos casos, Nitrógeno total (Nt) (Bremner, 1965), fosforo total en plántulas, por digestión vía húmeda y colorimétrica fue por Murphy y Riley (1962), en las muestras de sustrato se determinó el fósforo disponible empleando para ello extracción con NaHCO_3 , por el método de Olsen (Watable y Olsen, 1965) y su determinación colorimétrica fue por (Murphy y Riley, 1962), Potasio, Calcio y Magnesio en plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) merr) mediante el método por digestión húmeda detectada por absorción atómica (UCV, 1993); el pH y conductividad eléctrica todos los tratamientos en relación suelo-agua (Anderson y Ingram, 1993). Para estas evaluaciones químicas se tomaron dos muestreos, uno al momento de la remoción de las plántulas del medio de cultivo *in vitro* y el otro a los 90 días de aclimatización.

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar el efecto de abonos orgánicos realizados en las zonas de estudio para aclimatación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. merr).

Tratamiento	Concentración	N.º de vitroplantas
T0= Testigo	100% Tierra abonada (vivero comercial)	15
T1= Tratamiento 1	25% compost +75% tierra abonada	15
T2= Tratamiento 2	50% compost +50% tierra abonada	15
T3= Tratamiento 3	75% compost +25% tierra abonada	15
T4= Tratamiento 4	100% compost	15
T5=Tratamiento 5	25% vermicompost+75% tierra abonada	15
T6=Tratamiento 6	50% vermicompost+50% tierra abonada	15
T7=Tratamiento 7	75% vermicompost+25% tierra abonada	15
T8=Tratamiento 8	100% vermicompost	15

Análisis estadístico. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó a través del programa Statistix 8.0 El primer paso consistió en realizar una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA), se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey con un grado de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobrevivencia de las vitroplántulas de piña (*Ananas comosus* (L. merr.). Los resultados obtenidos en el estudio dan al T2 con mayor porcentaje de sobrevivencia en comparación con los demás tratamientos, como lo refleja la Figura 1. Cabe destacar que el porcentaje de sobrevivencia disminuyó sustancialmente después de los 60 días después de la siembra, presentando estrés en plántula, lo que generó marchites en las hojas progresivamente. Al respecto, Estrada *y col*, (2003) resaltaron que la aclimatación es el estado más crítico, siendo la última pero más arriesgada fase de la propagación *in vitro*, puesto que las plantas requieren de cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos para corregir anomalías de desarrollo y desempeño fotosintético inducidos por el desarrollo *in vitro*, siendo el principal problema la baja tasa de sobrevivencia.

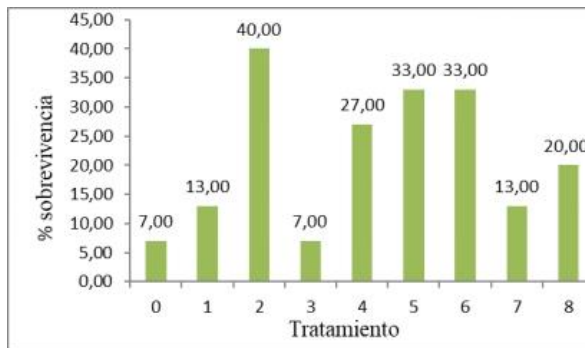


Figura 1. Porcentaje de sobrevivencia obtenida en los diferentes tratamientos de aclimatación de plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.)).

Raya y col. (2009), indicaron que las plantas formadas en condiciones *in vitro*, crecen en un ambiente controlado y son sometidas a cambios en la aclimatación pueden deshidratarse fácilmente y morir, al ser sacadas del laboratorio al proceso de aclimatación recomienda ser sumergidas en una solución de fungicida sistémico, utilizar sustratos estériles y llevarlas a condiciones de invernadero a humedad constante y baja radiación solar. Debnath (2005) indicó que, para alcanzar una tasa de supervivencia y rápida aclimatación en condiciones de invernadero, se debe mantener la humedad relativa de 90-95%. Este método ha sido usado para la aclimatación exitosa de *Gladiolus grandiflorus* (González y col., 2014).

Evaluación morfológica:

Altura de la plántula de piña (*Ananas comosus*) (L.) merr. Los resultados obtenidos en la variación de la altura de las plántulas en función de los tratamientos y número de días evidencian que el T2, T4 y T5 fueron significativamente superior al T8, y no se distinguen diferencias significativas entre los demás tratamientos, como se refleja en la Tabla 2. Sin embargo, el T2 es quien presenta la máxima altura promedio con respecto a los demás tratamientos con un valor de 8,43cm, mientras la mínima altura promedio la presenta el T8 con 6,34cm, es de resaltar que se establecieron tres grupos (a, ab y b).

Tabla 2. Efectos de los diferentes tratamientos sobre altura de las plántulas micropropagadas de piña (*Ananas comosus* (L.) merr). Var. Valera amarilla. Para la prueba de media Tukey.

Tratamiento	Dia							
	0	15	30	45	60	75	90	Promedio
0	6,50	6,53	6,98	6,98	7,35	6,72	7,35	6,92ab
1	7,46	7,47	7,03	7,03	6,24	6,51	8,75	7,21ab
2	8,57	8,60	8,73	8,74	7,50	8,43	8,43	8,43*
3	7,30	7,33	7,58	7,59	9,15	7,11	7,11	7,60ab
4	7,55	7,69	7,85	7,87	7,97	8,19	8,19	7,90a
5	7,11	7,25	7,23	7,23	7,43	7,43	12,00	7,96a
6	7,04	7,07	7,15	7,17	8,34	7,20	5,00	7,00ab
7	6,93	6,93	7,50	7,52	4,70	7,50	6,82	6,84ab
8	6,32	6,32	6,32	6,32	6,37	6,37	6,33	6,34b

Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.01)

En la Tabla 2 se observa la altura de las plántulas (cm) en función a cada tratamiento, el compost utilizado en la aclimatación contiene en este caso alto porcentaje de N (1.85), P (2.8) K (3.6) Ca (1.8) y en el caso del vermicompost N (1.95), P (2.9) K (3.9) Ca (3.5) como lo reportaron (Ramírez y col., 2012). Si durante la aclimatación se proporcionan adecuados niveles de nutrición, las plantas muestran mayor capacidad de crecimiento y vigor, así como mejor desarrollo y rendimiento económico en la posterior plantación definitiva (Enríquez y col., 2000). Se eligió el vermicompost y compost como alternativa de sustrato, ya que reúnen los siguientes requisitos: sirve de sostén de la plántula, permite el intercambio de aire, facilita la absorción de agua por las raíces y el drenaje, favorece la nutrición y en consecuencia el crecimiento de la plántula (Díaz y col.,

2004). Cabe mencionar Teixeira *y col.* (2001), señalaron que la piña requiere un largo período de aclimatación para alcanzar el tamaño apropiado debido a su naturaleza de crecimiento lento, teniendo en cuenta que este va relacionado directamente con las condiciones físicas y de fertilidad en conjunto con las condiciones climáticas favorables que permiten el desarrollo fenológico de la piña.

Tamaño de la roseta de piña (*Ananas comosus*) (L.) merr. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3, donde se pueden observar la variación del tamaño de la roseta, en función de los tratamientos y número de días, se evidencia que el T2, fue significativamente superior al T1 y al T8 y no presenta diferencias significativas con los demás tratamientos.

Tabla 3. Efectos de los diferentes tratamientos sobre tamaño de la roseta de las plántulas micropropagadas de piña (*Ananas comosus* (L.) var. Valera amarilla. Para la prueba de media Tukey.

Tratamiento	Día							
	0	15	30	45	60	75	90	Promedio
0	10,96	10,90	11,10	11,10	12,56	11,83	12,56	11,843ab
1	9,85	9,86	9,67	9,67	8,21	8,58	13,50	9,904bc
2	11,63	11,64	12,99	12,99	13,20	12,22	12,22	12,411 ^a
3	10,07	10,09	9,51	10,31	13,15	8,71	8,71	10,468abc
4	10,35	10,44	9,66	10,70	11,40	10,78	10,78	10,792ab
5	10,11	10,23	10,22	10,22	10,56	10,56	16,05	11,137ab
6	10,35	10,36	10,82	10,83	11,11	9,94	9,08	10,496abc
7	9,99	9,99	10,31	11,36	7,35	11,33	11,33	10,236abc
8	8,04	8,05	8,28	8,28	7,61	8,31	9,00	8,324c

Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.01)

Cabe citar a Saucedo *y col.* (2008) quienes señalaron la importancia del desarrollo de la roseta de la piña, puesto que va directamente involucrada a la amplitud de las hojas, ya que según su morfología son entre puestas, originando mayor proyección aérea para mayor trabajo fotosintético de la planta, como se detalla en la Tabla 3 el comportamiento de los diferentes tratamientos en respuesta al crecimiento de la roseta de la plántula. Rondón *y col.* (2007 y 2009), señalaron que la piña está formada por la base de hojas insertadas en el tallo y el propio tallo, que almacenan la reserva de azúcares no estructurales y solubles, azúcares no estructurales como la celulosa y hemicelulosa presentes en las fibras y también agua. Siendo muy probable, el diámetro de la piña estima el tamaño de la reserva de los azúcares totales no estructurales solubles y polisacáridos, y el tallo principalmente, la reserva de polisacáridos.

Número de hojas por plántula de piña (*Ananas comosus*) (L.) merr. Los resultados arrojados evidencian que el T3 fue significativamente superior a los T1, T2, T4, T7 y al T0 y no presentó diferencias significativas con los demás tratamientos como se detalla en la Tabla 4. El desarrollo de la piña adulta llega a tener de 70 a 80 hojas siendo una planta CAM, donde la apertura de las estomas es invertida, de allí la importancia de la cantidad de hojas de la planta de piña (Saucedo *y col.*, 2008).

Tabla 4. Efectos de los diferentes tratamientos sobre número de hojas de las plántulas aclimatadas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Var. Valera amarilla. Para la prueba de media Tukey.

Tratamiento	Día							Promedio
	0	15	30	45	60	75	90	
0	11,93	11,93	11,17	11,17	12,50	12,11	12,50	11,19f
1	12,87	12,87	12,02	12,17	12,55	12,30	13,50	12,63ef
2	14,07	14,07	14,38	14,25	14,00	12,50	12,50	13,68def
3	17,20	17,20	17,69	18,08	18,00	15,40	16,40	17,22a
4	14,40	14,40	14,87	14,93	17,67	14,00	14,00	15,20 bcd
5	16,27	16,27	16,07	16,07	16,15	16,15	20,00	16,71ab
6	15,93	15,93	15,83	15,83	16,57	15,70	13,40	15,60abcd
7	14,53	14,53	13,09	14,50	17,50	13,10	13,10	14,35cde
8	15,87	15,87	16,00	16,00	15,67	16,40	17,67	16,20abc

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.01$)

Los resultados obtenidos para esta variable morfológica se asemejan a los obtenidos en la investigación realizada Betancourt y Suarez (2009), donde el mayor número de hojas de plántula de piña se presentó en los tratamientos que contenían mayor porcentaje de abono orgánico, presentando diferencias significativas con los demás tratamientos.

Evaluaciones Químicas:

Determinación de pH y conductividad eléctrica de los sustratos. La Tabla 5, muestra los resultados promedios de pH y conductividad eléctrica de los sustratos empleados en cada tratamiento. Cabe destacar que los valores de pH se asemejan a los sugeridos por Ortega (2010), que señalan que los valores de pH para los sustratos en el proceso de aclimatación deben oscilar entre 6,5 – 7 y difieren de otros autores como Matos y col. (2000), quien señalaron que el pH de los sustratos debe estar entre 5 y 6,5 en el proceso de aclimatación.

En cuanto a la conductividad eléctrica, los valores obtenidos están por encima de 3 mScm^{-1} ; estos resultados difieren de las recomendaciones dadas por Ortiz (2000), quien señaló que las plantas aclimatadas en sustratos con conductividad eléctrica superior a 3 mScm^{-1} tienen baja tasa de sobrevivencia ya que presentan toxicidad. Mientras que Matos y col. (2000), señalaron que si el valor de conductividad eléctrica excede a 2 mScm^{-1} las plantas corren alto riesgo de sufrir fitotoxicidad. Se presume la alta conductividad eléctrica fue la causa para la alta tasa de mortalidad de las plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.).

Tabla 5. Valores químicos del sustrato utilizado al momento de la aclimatación de las plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.).

Tratamiento	pH	Conductividad eléctrica (mS cm^{-1})
T0	6,90	3,15
T1	6,95	4,85
T2	7,05	4,83
T3	6,66	6,13
T4	6,75	5,14
T5	6,91	3,98
T6	7,32	5,09
T7	7,72	3,97
T8	7,52	5,27

Determinaciones de macro y microelementos para las plántulas de piña al inicio del ensayo de aclimatación. En la Tabla 6 se observan los valores para los elementos químicos de dos muestreos de las plántulas obtenidas *in vitro* que posteriormente fueron llevadas a la fase de aclimatación. Es importante resaltar que al final de la fase de aclimatación no se pudieron realizar los muestreos correspondientes por el alto porcentaje de mortalidad. En la Tabla 7, se reflejan los valores de los análisis químicos de las plántulas de piña por tratamiento a los 90 días después de la siembra.

Tabla 6. Valores químicos al momento de la remoción de los medios de cultivo de las plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) merr).

Número de muestreo	Nt (%)	Pt ppm (mg/kg)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
M1	0,2806	147,375	0,64	0,18	0,24
M2	0,9923	49,125	0,68	0,26	0,12
Promedio	0,6364	66,5	0,66	0,22	0,18

Tabla 7. Valores químicos a los 90dds de macro y micronutriente las plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) merr).

Tratamiento	Nt (%)	Pt ppm (mg/kg)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
T0	0,11725	108,84	7,5	0,7	0,5
T1	0,16975	1872,11	4,58	0,54	0,38
T2	0,3267	337,41	4,42	0,28	0,3
T3	0,34183	2089,80	5,6	0,4	0,36
T4	0,30683	1828,57	4,66	0,36	0,34
T5	0,67433	1621,77	6,84	0,42	0,34
T6	0,50017	718,33	6,84	0,32	0,28
T7	0,368008	1523,81	6,5	0,3	0,36
T8	0,41475	1229,93	10,08	0,24	0,38

Las Tablas 6 y 7 muestran las cantidades de macro y micronutrientes de las plantas de piña en referencia a los sustratos empleados en comparación a la fase inicial y haciendo referencia al testigo a los 90 dds, no obstante, por la falta de réplicas a causa de la alta tasa de mortalidad en esta etapa de aclimatación no fue respaldada estadísticamente.

CONCLUSIONES

La incorporación de compost al suelo favorece el desarrollo de vitroplantulas de piña (*Ananas comosus* (L.) merr), teniendo en cuenta que los tratamientos que contenían mayor concentración de biofertilizantes en el sustrato, tuvieron mejor resultado en el crecimiento, en relación al número de hojas, presentando diferencias significativas con los demás tratamientos y superior al testigo. El desarrollo de las vitroplantulas en la fase de aclimatación con los diferentes tratamientos expresados en términos de altura, así como el número de hojas muestran diferencias significativas entre ellos, destacando los tratamientos que contenían compost sobre el vermicompost. Los resultados indican que el uso de biofertilizantes favorece la sobrevivencia y crecimiento de las plántulas en la fase de aclimatación.

LITERATURA CITADA

- Anderson, J. y J. Ingram. 1993. Tropical soil biology and fertility. A handbook of methods. Segunda Edición. CyB. International. UK. Pp62-66.
- Astaiza, C. 2002. Disponibilidad de nutrimentos en tres tipos de compost. (Tesis inédita de Maestría). Centro Agronómico Tropical para la Investigación y enseñanza CATIE, 66.
- Betancourt, P y J. Suarez. 2009. Efectos del Humus líquido de lombriz en el desarrollo de vitropiantas de piña (*Ananas comosus* L. merr) en el proceso de aclimatación (pp. 205-213), serie de manuales de cultivo INEA N° 8 Lara, Venezuela: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Bremner, J. 1965. Total Nitrogen. En: Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological properties. Agronomy Monograph 9(2ª edición), Eds A.L.
- Castañeda, P. 2003. Manual Técnico. Seminario sobre producción y manejo de post cosecha de la piña de exportación. Proyecto Nacional de Fortalecimiento de la vigilancia fitosanitaria en cultivos de exportación no tradicional. VIFINEX. El Salvador.
- Díaz, L., L. Medina, J. Latife, P. Digonzelli y S. Sosa. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz INTA, Argentina. *RIA* 33(2): 115-128.
- Debnath, S.C. 2005. Strawberry Sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro Cellular y Developmental Biology. Plant.* 41(5):671-676. DOI: 10.1079/IVP200568,
- Enríquez, R.G., C.P. Carrillo, G. Sánchez, M. Rodríguez y C. Mendoza. 2000. Fertilización para la óptima adaptación y vigor de vitropiantas de tomate Quintana (*Lycopersicon esculentum* Mill.) obtenidos *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 23(1): 59-67.
- Estrada, A., J. Davies y T. Fred. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chileancho pepper (*Capsicum annum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *J. Plant Physiol.* 160(9):1073-1083.
- González-Pérez, E., J. Juárez-Muñoz, O.J. Ayala-Garay y M.J. Yáñez-Morales. 2014. *Ex vitro* acclimatization of gladiolus plantlets. *Propagation of Ornamental Plants* 14(3):125-132.
- Matos, A., J. Molina y D. Acosta. 2000. Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. *Ciencia* 8(3): 280-284.
- Murashige, T y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and and biosys with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Murphy, J. y H.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta* 27: 31-36.
- Ortega, L. 2010. Efecto de sustratos en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de invernadero. (Tesis de inédita de Maestría). Universidad Autónoma Indígena de México.
- Ortiz, R. 2000. Factores que afectan el desarrollo de vitropiantas de caña de azúcar en la fase adaptativa. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas Cuba. ISBN: 959-7029-12-1
- Ramírez, E., R. Hernández y E. González. 2012. Variación de características químicas de diferentes compost, elaborados en bosques nublados de la cordillera de la costa. Proyecto FONACIT N° 2012000074. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Miranda, Venezuela.
- Rendón, L.A., A. Magdub, L. Hernández y A. Larqué. 2007. El jarabe de henequén (*Agave fourcroydes* Lem). *Rev. Fitotec. Mex.* 30(4):463-467.

- Rendón, L.A., M.P. Colunga, L.F. Barahona, E. Pimienta, A. Magdub y A. Larqué. 2009. Sugars and alcoholic byproducts from henequen (*Agave fourcroydes*) as influenced by plant age and climate. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(1):39-44.
- Raya Montaña, Y.A., A. Villegas Monter y GG. Arellano Osta. 2009. Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Revista Fitotecnica Mexicana* 32(2):111-117.
- Saucedo, S., L. Ramos, E. Varas y C. Fred. 2008. Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr). Variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología* 1:49-54.
- Teixeira, J., A. Cruz, F. Ferreira y J. Cabral. 2001. Biotechnology applied to seedling production: production of pineapple plantlets. *Science and Biotechnology Development* 3:42-47.
- Universidad Central de Venezuela. 1993. Métodos de análisis de suelo y plantas utilizadas en el laboratorio general de suelos del Instituto de Edafología, Cuadernos de Agronomía. Facultad de Agronomía – UCV. Año 1, N°6. Maracay, Venezuela. 89 p.
- Watable, F. y S. Olsen. 1965. Test of an acid arcorbic methods for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Science Society of American Proceeding* 29: 677-678.