

Ciencias técnicas y aplicadas

Artículo de Revisión

Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero

Biotic and abiotic factors influencing acclimatization in the greenhouse

Fatores bióticos e abióticos que influenciam a aclimação na estufa

Dra. Silvia Montes-Cruz¹, PhD. José M. Lalama-Aguirre², Mg. José M. Echeverría-Félix^{1,2}, Mg. Santiago M. Salazar-Torres^{1,2}

montessilvia67@gmail.com, jmlalama@uce.edu.ec, jecheverria@utn.edu.ec, ssalazar@utn.edu.ec

^{1,2,3}Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador, ²Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

Recibido: 2 de febrero de 2016

Aceptado: 31 de mayo de 2016

Resumen

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica actualizada que permitiera analizar los inconvenientes y las soluciones que se presentan durante las fases de crecimiento y desarrollo de las vitroplantas en invernadero y vivero. Se constató que durante la fase “in vitro”, las plantas se desarrollan bajo condiciones controladas, hay restricción del flujo gaseoso, alto contenido de humedad en el aire, la intensidad de luz es menor, y se recurre a la utilización de los azúcares como fuente de carbono y energía. El trasplante de las vitroplantas y el establecimiento completo en invernadero puede ser complejo para algunas especies, pues en las plantas “in vitro” se producen anomalías fisiológicas, estructurales y anatómicas, tales como la ausencia de cutícula cerosa, estomas no funcionales, falsas raíces, la ineficiencia de la fotosíntesis y el mal funcionamiento del transporte hídrico; estas anomalías son acentuadas como resultado de las tasas de evapotranspiración elevadas, ya que pasan de una condición semi o heterótrofa a una autótrofa. La recopilación

sintetizada de investigaciones realizadas sobre factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero, que se han plasmado en este trabajo nos ha permitido ampliar el conocimiento, llevar a la práctica y obtener mejores resultados en la propagación de plantas a través de la técnica *in vitro*, fundamentalmente en la fase de aclimatación, comprendiendo que esta concluye con un análisis anatómico y fisiológico de las plantas obtenidas en laboratorio antes de llegar a campo.

Palabras clave: cultivo "in vitro", aclimatación, heterótrofa, autótrofa.

Abstract

The aim of this paper is to review the literature to date it possible to analyze the problems and solutions presented during the phases of growth and development in the greenhouse and nursery. It was found that during the "in vitro" plants grow under controlled conditions, no restriction of gas flow high moisture content in the air, the light intensity is less, and resorts to the use of sugars as carbon and energy source. Transplanting the plantlets and complete establishment in greenhouses can be complex for some species, as in plants "in vitro" physiological, structural and anatomical, such as the absence of waxy cuticle, nonfunctional stomata, false roots anomalies occur, inefficiency of photosynthesis and malfunction of water transport; these abnormalities are accentuated as a result of high evapotranspiration rates because they spend a semi condition or heterotrophic to autotrophic. The synthesized compilation of research on biotic and abiotic factors influencing acclimatization in the greenhouse, which are reflected in this work has allowed us to expand knowledge, implement and achieve better results in the spread of plants through the technique *in vitro*, mainly in the acclimatization phase, understanding that this concludes with an anatomical and physiological analysis of plants obtained in the laboratory before reaching field.

Key words: cultivation "in vitro", acclimatization, heterotrophic, autotrophic.

Resumo

O objetivo deste artigo é revisar a literatura até à data possível analisar os problemas e as soluções apresentadas durante as fases de crescimento e desenvolvimento na estufa e viveiro. Verificou-se que, durante os "in vitro" plantas crescem sob condições controladas, sem restrição do fluxo de gás com elevado teor de humidade no ar, a intensidade da luz é menor, e recorre-se à utilização de açúcares como fonte de carbono e energia. O transplante das mudas e estabelecimento completo em estufas pode ser complexa para algumas espécies, como em plantas "in vitro" fisiológico, estrutural

e anatómico, tais como a ausência de cutícula de cera, estômatos não-funcionais, anomalias falsas raízes ocorrer, ineficiência da fotossíntese e mau funcionamento do transporte de água; essas anormalidades são acentuadas, como resultado de taxas de evapotranspiração elevada, porque eles gastam uma condição semi ou heterotrófica para autotrófica. A compilação sintetizado de pesquisa sobre fatores bióticos e abióticos que influenciam a aclimação em casa de vegetação, que se reflectem neste trabalho nos permitiu ampliar o conhecimento, implementar e alcançar melhores resultados na propagação de plantas através da técnica in vitro, principalmente na fase de aclimação, entendendo que esta conclui com uma análise anatómica e fisiológica das plantas obtidas em laboratório antes de campo chegando.

Palavras chave: cultivo "in vitro", aclimação, heterotróficos, autotrophic

Introducción

El empleo de la Biotecnología Vegetal y en particular el cultivo “in vitro” ha demostrado ser una herramienta poderosa para la reproducción de plantas, siendo una vía muy competitiva con relación a los procedimientos tradicionales de propagación vegetativa.

La micropropagación es básicamente una técnica de clonación por lo que es posible producir poblaciones uniformes de plantas; a la vez el ambiente controlado del laboratorio en el cual se realiza el proceso, que contribuye a una mayor uniformidad de las plantas que se obtienen.

En la segunda mitad de la década de los ‘90, varias zonas azucareras de países como Cuba, EE UU, Brasil y Colombia, entre otros, comienzan a implementar a escala comercial el uso de las técnicas de cultivo de meristemas y micropropagación, en algunos casos involucrando organismos de la ciencia y técnica y en otros, con la participación del sector privado, (Chavanne, et al., 2008).

La biotecnología puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de frutales; esta tecnología permite obtener material de elevada productividad. Además, el cultivo de tejidos ha dado un gran aporte a la agricultura y constituye una vía fundamental en la actividad científico-tecnológica, por lo que el empleo de las técnicas de propagación in vitro en frutales resulta una vía valiosa para la multiplicación, el rescate y la conservación de estas especies.

El uso de técnicas biotecnológicas ofrece la posibilidad de multiplicar masivamente genotipos valiosos incluyendo los frutales que se encuentran amenazados, como el marañón (*Anacardium occidentale* L.), por lo que puede contribuir al aumento y mejoramiento de la

producción de especies de importancia económica. A partir de los resultados de los últimos años, en una gran cantidad de especies vegetales se ha extendido el empleo de las técnicas biotecnológicas, por lo que resulta valiosa la aplicación de estas en las especies frutales. De aquí que el objetivo del presente trabajo consiste en resaltar la importancia de esas técnicas biotecnológicas en la multiplicación, el rescate y la conservación de los frutales, justificando así su inclusión en los programas agrícolas. (Kessel, A, 2008,).

Son múltiples las ventajas que ofrece este sistema de multiplicación de genotipos promisorios, entre las que se pueden citar: una mayor rapidez en la reproducción de plantas élites, teóricamente se puede reproducir una amplia población uniforme a partir de una sola planta y obtener alta homogeneidad fenotípica y genotípica en las variedades, lo que propicia que se alcancen mayores rendimientos. Esta aplicación es válida para cualquier cultivo en la agricultura; y se logran altos coeficientes de propagación en la mayoría de los casos, pudiendo obtenerse hasta un millón de plantas a partir de una sola, en un periodo de 12 a 24 meses. Los beneficios de esta técnica permite la entrada rápida al mercado de nuevos clones o selecciones, ahorrándose varios años en comparación con los métodos tradicionales (Sosa, R., F.M et al 2009).

A través del término aclimatación es posible expresar la acción de adaptación que sufre un ser orgánico a un cambio climático o en su defecto a nuevas condiciones de vida que se le imponen. Es decir, la aclimatación implicará para el organismo en cuestión una adaptación de tipo fisiológica como consecuencia de los cambios que se producen en su entorno natural, y que claro, los mismos se hallan en estrecha vinculación a la cuestión climática.

Cabe destacarse que el proceso de aclimatación suele durar un período corto de tiempo dentro de la vida del organismo que corresponda, en tanto, puede resultar de una situación particular o bien ser parte de un ciclo que se repetirá cada vez que sea necesario. Entre los ejemplos más claros de esto que mencionamos podemos citar el cambio de pelaje que sufren algunos mamíferos cuando está legando el invierno o asimismo la caída de cabello cuando se está en determinada fase del año.

Por otro lado, en el caso de las plantas, también habrá aclimatación cuando las circunstancias del medio así lo demanden, porque por ejemplo aquellas plantas que viven en zonas de características desérticas suelen almacenar agua en sus hojas para que cuando falte el agua esto no mine la supervivencia de la planta porque en efecto cuenta con una reserva que le permitirá seguir viviendo.

Sin lugar a dudas el proceso de aclimatación es una característica híper positiva para la supervivencia de los seres vivos y también para su satisfactoria permanencia en el entorno en el que se encuentran. ... vía Definición ABC (<http://www.definicionabc.com/medio-ambiente/aclimatacion.php>).

El mayor porcentaje de pérdidas de plantas producidas in vitro ocurren en su fase de aclimatación transferencia al suelo cuando deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente edáfico. Casi todo el esfuerzo investigativo del cultivo de tejidos se perderían si las plantas que se regeneran murieran cuando se intenta desarrollarlas en un ambiente que en un comienzo les resulta desfavorable. (Torrejón G., 2006).

El éxito de la propagación in vitro radica en lograr la aclimatación de las vitroplantas a las condiciones ambientales. Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico de las vitroplantas, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales, asimismo en esta etapa las plántulas sufren un estrés provocado por el cambio de las condiciones de humedad y temperatura, por lo que la transferencia debe realizarse de forma gradual. (Torrejón G., 2006).

La supervivencia de las vitroplantas regeneradas durante el periodo de adaptación depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo in vitro, lo cual permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa) y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Morales 2013); (Torrejón G. 2006).

La supervivencia de las vitroplantas regeneradas durante el periodo de adaptación depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo in vitro, lo cual permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa) y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo. (Torrejón G., 2006).

En cultivos industriales agrícolas y en flores, la homogeneidad en la población posibilita una mayor planificación de las cosechas y reducción del tiempo dedicado a esta labor; debido a que el sistema es llevado a cabo en condiciones controladas del laboratorio, sin influencia de la estación del año o el clima, y el material de partida son brotes de plantas de reducidos tamaños, el número de plantas

que se producen por áreas es mucho mayor que en los invernaderos o en condiciones de campo. El valor del producto se incrementa como consecuencia de la obtención de plantas sanas, libres de hongos, bacterias y virus así como con el diagnóstico correspondiente.

Metodología

Se refiere a una investigación de tipo documental, con el objetivo de describir la influencia de los factores bióticos y abióticos en la aclimatación de las vitroplantas bajo invernadero. Se realizó una extensa revisión bibliográfica sobre el tema, para lo cual se seleccionaron revistas científicas especializadas nacionales e internacionales considerando como criterios para su selección los puntos a tratar y los autores e investigadores reconocidos en el área. La información histórica y estadística que se presenta se obtuvo de la revisión y procesamiento de la información en páginas Web, se realizó una búsqueda de información en las bases de datos Ebsco, Gale, Taylor & Francis, BioOne y Proquest; en fuentes de información disponibles en internet, repositorios de universidades, entre otros. Se corrieron los siguientes descriptores: propagación de plantas “in vitro”, micropropagación de plantas, aclimatación de plantas, vivero de plantas bajo invernadero, factores ambientales para el crecimiento de las plantas. La información se recuperó sin restricción de fecha de publicación, pero fue priorizada aquella realizada en los últimos diez años, sin excluir la que fue considerada por los autores como necesaria para dar la perspectiva histórica de las ideas.

Desarrollo

Factores que intervienen en la producción de vitroplantas

Durante la etapa de cultivo “in vitro”, las plantas se desarrollan bajo condiciones controladas, incluidos los ambientes cerrados, hay restricción del flujo gaseoso en los recipientes de cultivo con alto contenido de humedad en el aire, la intensidad de luz debe ser baja, y se recurre a la utilización de los azúcares del medio como fuente de carbono y energía (Vilchez, J., et al., 2009) por lo tanto, el trasplante de las vitroplantas y el establecimiento completo en el invernadero puede ser complejo para algunas especies; el mantenimiento de las plantas “in vitro” produce anomalías fisiológicas, estructurales y anatómicas (Morales, et al 2013).

El trasplante de las vitroplantas y el establecimiento completo en invernadero puede ser complejo para algunas especies, pues en las plantas “in vitro” se producen anomalías fisiológicas,

estructurales y anatómicas, tales como la ausencia de cutícula cerosa, estomas no funcionales, la ineficiencia de la fotosíntesis y el mal funcionamiento del transporte hídrico; estas anomalías son acentuadas como resultado de las tasas de evapotranspiración elevadas, ya que pasan de una condición semi o heterótrofa a autótrofa. (CapelladesM, .1990).

Los cambios más importantes ocurren en el desarrollo de la cutícula, como la ausencia de cutícula cerosa, menor presencia de ceras epicuticulares, ya que varía la composición química, el grosor de las hojas generalmente se aumenta, el mesófilo de éstas incrementa su diferenciación.

La regulación estomática efectiva de la transpiración que conduce a la estabilización del estatus de agua en las plantas, se afecta debido a la presencia de estomas no funcionales, la densidad estomática disminuye y su forma cambia de circular a elíptica, presentan células en empalizada más pequeñas y más espacios aéreos entre el mesófilo, hay ineficiencia de la fotosíntesis, y el mal funcionamiento del transporte hídrico, (Sosa R. FM et al., 2009), (Noé, et al, 1996).

Las anomalías en las vitroplantas son acentuadas como resultado de las tasas de evapotranspiración elevadas ya que pasan de una condición semi o heterótrofa a autótrofa. De otra parte, el efecto invernadero y de campo condicionan en las vitroplantas una menor humedad relativa sustancial en comparación con las condiciones en que se desarrollan y crecen las plantas producidas en laboratorio; es por ello que el aumento de los niveles de luz y el medio ambiente sépticos son estresantes para las plantas micro propagadas en comparación con las condiciones "in vitro"; ya que la planta requiere de una mayor tasa de intercambio gaseoso con el ambiente, lo que podría resultar en un aparato estomático de mayores dimensiones. (Vilchez J. et al., 2007).

Se ha reportado que las plantas cultivadas in vitro tienen una mala conductividad hídrica en las raíces, y que no hay conexiones adecuadas entre la raíz y el tallo. El mal transporte del agua, junto a una mala retención del agua en las hojas, puede llevar a que estas se sequen rápidamente. En varios reportes, se logra el enraizamiento y aclimatación de plantas en un mismo sustrato, pero en la investigación con mortiño, se realizó el enraizamiento in vitro y aclimatación en fases separadas. Sin embargo, es posible que el método usado para enraizar las plantas de mortiño no sea el adecuado, ya que no se obtuvo ningún resultado positivo en la aclimatación hasta el momento. (Torres P M. L., et al. 2008).

Estudios realizados con plantas de *Laeliaeyermaniana* Rchb. f. obtenidas in vitro. En las que se analizaron preparaciones histológicas para observar diferentes etapas, desde la germinación hasta la aclimatación ex vitro. Las fotomicrografías de las preparaciones mostraron varios estadios

transitorios. Se identificaron y describieron siete estadios relativos de desarrollo: semilla, protocormo no fotosintético, protocormo fotosintético, protocormo en diferenciación, plántula con hojas, plántulas con hojas y raíz, plántula con hojas y dos raíces. Así como también, dos fases transitorias: masa embrionaria somática (MES) y cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) por sus siglas en inglés, obtenidos por embriogénesis somática indirecta. La densidad estomática en las hojas se duplicó bajo condiciones *ex vitro*. Este estudio contribuye al conocimiento del desarrollo morfológico de *L. eyermaniana* durante su cultivo *in vitro* y aclimatación *ex vitro*. (Nava F. J. J et al 2011).

La aclimatación de vitroplantas. Consideraciones generales.

Aclimatación es el proceso en el cual un organismo individual se ajusta a un gradual cambio en su entorno (por ejemplo, un cambio en temperatura, humedad, fotoperiodo o pH), lo que le permite mantener el rendimiento en una amplia gama de condiciones ambientales. La Aclimatación se produce en un período corto de tiempo (días a semanas) y dentro de toda la vida del organismo.

La aclimatación de vitroplantas consiste en el paso de condiciones “*in vitro*”, a condiciones donde se desarrollarán para su cultivo, con el objetivo de que éstas superen las dificultades cuando son removidas del ambiente “*in vitro*”; de esta manera, se preparan para su trasplante definitivo. (Vilchez J. et al, 2007).

El logro de la actividad de fotosíntesis durante la fase de endurecimiento constituye una etapa decisiva en la adaptación a las condiciones naturales, de lo contrario ocurre la muerte de las plantas fundamentalmente por deshidratación. Los estudios acerca del comportamiento del sistema radical de las vitroplantas se han basado fundamentalmente en el análisis de la dinámica de crecimiento de las variables número de raíces, longitud de las raíces, masa fresca y seca (Ortiz, R., et al 2000),(Ramírez L, et al, 2010).

De manera general, al momento del trasplante, se emplean diferentes sustancias enraizadoras solas o en combinación con algún fungicida, variando las dosis y el tiempo de exposición. Sin embargo, se ha prestado menos atención al análisis histológico detallado, que posibilite realizar el monitoreo acerca del origen y evolución de las raíces, dónde se forman, si son aéreas o cerca de la base de la planta, si tienen o no conexiones vasculares, la conductividad de las mismas; algunos autores

señalan que es posible que las raíces no sean funcionales a pesar de que tengan conexiones vasculares. (Trujillo D, 2008).

Cualquier tecnología que sea establecida para la etapa de aclimatización de vitroplantas, debe garantizar altos porcentajes de supervivencia y un crecimiento rápido de las mismas dada la influencia del sistema radical de éstas. El porcentaje de sobrevivencia es un indicador muy importante en la fase de climatización, pues de él depende la cantidad de plantas que pueden llevarse a vivero y posteriormente al campo.

Lo antes señalado solo se logra cuando se implementan tecnologías en la fase de aclimatización adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de cada región o país, ya que de lo contrario se incurre en pérdidas superiores tales, que hacen incosteable el llevar a cabo la producción de ejemplares mediante este procedimiento, por lo que no resulta ventajoso el empleo de esta vía de propagación inicialmente.

El enraizamiento de los brotes generados se logra en la mayoría de los casos transfiriéndolos a un medio carente de reguladores del crecimiento. En algunas especies sólo es necesario agregar al medio de cultivo auxinas o bien carbón activado con el fin de estimular la generación de raíces. La adaptación al suelo y al ambiente externo de las plántulas generadas in vitro ocurre sin problemas, siempre y cuando la transferencia se haga después de un proceso de adaptación paulatina. (Domínguez R. et al 2008).

Así, una estrategia de aclimatación es someter a las plántulas a un cambio gradual de las condiciones ambientales para inducir su desempeño autótrofo (Pedraza et al., 2001); (Aragón C et al., 2006). (Izquierdo H et al., 2009). (Mroginski et al., 2010).

Aclimatación de las plántulas

Las plántulas para aclimatación, se subcultivan en el medio MS, hasta que presentan dos o más hojas y raíces. Con base en los criterios sugeridos por Rawson y Gómez (2001), las plántulas se clasifican en: grandes (mayores de 3 cm, con dos o más hojas y raíces), medianas (1.5 a 3 cm; 1 a 2 hojas y raíces) y pequeñas (menores 1.5 cm con una hoja y raíz). Posteriormente se transfiriere a macetas de plástico de 6.7 cm de altura y 6.0 cm de ancho, utilizando como sustrato fibra de palma soyate (*Braheadulcis* (H.B.K.)). Las macetas se colocan en charolas con domo transparente y se exponen a un ambiente controlado [temperatura de 25 + 2°C, fotoperiodo de 16/8 hr. de oscuridad y

46 Lmolm²s⁻¹ de intensidad luminosa (Quantum Meter ApogeeMod. QMSW-SS)]. Cada 15 días el domo se abre de manera paulatina hasta que las plántulas quedan completamente expuestas, lo cual ocurre a los 45 días. Permanece bajo las mismas condiciones hasta completar 90 días de cultivo.

El porcentaje de sobrevivencia de las plantas al final del periodo de aclimatación, se obtiene multiplicando el número de plantas vivas por 100, y dividiendo el resultado entre el número inicial de plántulas sembradas. Por otro lado, se cuantifica el número de estomas por mm² en la región abaxial y adaxial en hojas de plantas in vitro, y a los 90 días de aclimatadas. (Nava F J. J., et al., 2011).

La propagación in vitro de la orquídea silvestre *Laeliaeyermaniana*Rchb. f. mediante la germinación de semillas y a través de PLBs. El desarrollo morfológico desde su germinación hasta la formación de plantas, presenta siete fases regenerantes claramente definidas. La aclimatación de las plantas se logra a los 60 días de exposición a un ambiente controlado en ejemplares de tamaño grande, que presentan pseudobulbo, y de dos a cuatro hojas y raíces desarrolladas. Las condiciones ambientales predominantes durante la adaptación a las condiciones ex vitro, inducen a la duplicación de la densidad estomatal. (Nava F J.J, et al., 2011).

Para la aclimatación en invernadero de mora *Rubusadenotrichus* se han utilizado las vitroplantas provenientes de cada uno de los tratamientos de inmersión temporal en un sustrato compuesto de suelo, carbón vegetal y granza de arroz (3:1:1). Se evaluó la sobrevivencia durante cuatro semanas, monitoreando la humedad relativa y la temperatura promedio durante la mañana, el mediodía y la tarde utilizando un termohigrómetro digital.

Para el manejo de las vitroplantas se aplicó el protocolo establecido por Flores y colaboradores (2011). Durante la primera semana de aclimatación, las vitroplantas se mantuvieron en oscuridad en cajones de madera previamente desinfectados con una solución bactericida de sulfato de estreptomicina al 80% y clorhidrato de oxitetraciclina al 75% (5.0g/L) y el fungicida ziram al 76% (5.0g/L). A los ocho días se realizó la aplicación de una fórmula foliar de polisacáridos (35%), ácidos fúlvicos (0,1%), aminoácidos (0,1%), boro (2%), nitrógeno (6,5%) y potasio (23%) (5ml/L). Durante la segunda semana se procedió a la apertura de los cajones, lo cual condujo a un incremento de la luminosidad y una disminución de la humedad relativa. Al final de esta semana se aplicó una fórmula foliar de ultimnerales NPK 11-8-6 con porcentajes menores al 1% de Mg, S, CaO, B, Cu,

Fe, Mn, Mo y Zn (5ml/L), repitiendo la dosis al final de la tercera y la cuarta semana de evaluación. (Flores, D., et al, 2011).

Para el ensayo de enraizamiento in vitro, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza ANDEVA de una vía utilizando el programa estadístico de StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analyses software system), versión 7.0. Se aplicó la prueba de un análisis comparativo de medias de cada promedio utilizando Tukey para cada variable con un nivel de confianza del 95.0%. Para el ensayo de aclimatación en invernadero se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las vitroplantas enraizadas provenientes de cada uno de los tratamientos implementados en el laboratorio. Resultados y discusión Enraizamiento in vitro Para la variable longitud de tallo se presentaron diferencias significativas; sin embargo, para la longitud de la raíz y el número de entrenudos no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. La mayor longitud promedio del tallo se obtuvo en T1 (0,125mg/L AIB), la cual fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, incluyendo el control (P=0,000). Con respecto a la longitud promedio de la raíz, se determinó que a pesar de que no se presentaron diferencias significativas (P=0,057) entre los tratamientos, el Control (T3) fue el que mostró la mayor longitud promedio. Para el número de entrenudos no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (P=0,434). (Flores, D., et al, 2011).

Las plantas de *Brassavolaperrinii* (Orchidaceae) y de Tres Híbridos Intergenéricos, obtenidas en todos los medios ensayados fueron separadas en tres lotes (hasta 10 mm de longitud de la parte aérea, entre 10 y 20 mm, y entre 21 y 50 mm) y transferidas a macetas conteniendo corteza de pino triturada, carbón vegetal y perlita (1:1:1). Las macetas fueron mantenidas durante 30-45 días en un cuarto climatizado, con 14 horas de fotoperíodo, a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, las macetas fueron transferidas a un invernadero (malla reductora de luz del 80%), donde permanecieron durante 195-210 días. Las plantas fueron fertilizadas dos veces por mes con 2 mL/L de un fertilizante foliar (6-3-5) durante 2 meses, y luego con 5 mL/L de otro fertilizante foliar (11-8-6). Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas. Al cabo de 100 días de cultivo in vitro las plantas fueron transferidas a condiciones ex vitro, y luego de 240 días de aclimatadas se pudo apreciar que las pérdidas de plantas dependían del material vegetal y del medio de cultivo en el que se originaron. (Vidoz, M L. et al, 1999).

Factores que intervienen en la fase de aclimatación de vitroplantas

a) Calidad de la vitroplantas

Durante la fase de desarrollo de las vitroplantas, existen factores que pueden impedir un adecuado crecimiento y desarrollo de las mismas. El medio de cultivo y su composición juegan un papel importante, ello se logra con protocolos que se establecen en los diversos laboratorios relacionados con el tema; donde se precisan las cantidades adecuadas de reguladores de crecimiento a emplear, los momentos para la realización de los subcultivos, la intensidad de la luz, por solo citar algunos elementos a considerar.

Durante este proceso de multiplicación, existe asincronía en el desarrollo de las vitroplantas, de modo que no todas tienen el mismo grado de desarrollo, es por ello que resulta conveniente realizar una clasificación de las mismas en función del tamaño alcanzado antes de proceder a su transferencia al invernadero (Argelys, 2008).

En muchos casos se recurre a la siembra en cepellones de todas las plántulas que tienen el mismo porte, en otros, solo se sacan las de mayor talla y se mantienen en cultivo “in vitro” las de menor crecimiento y desarrollo. Resulta comprensible que aquellas vitroplantas de mayor talla, serán las que mejor se adapten a las nuevas condiciones de cultivo en los invernaderos (Ortiz, R, 2000).

Las variables que usualmente son indicadoras de vigor y que se evalúan son:

La altura de las vitroplantas, el número de hojas, el largo y ancho de las mismas, el número y longitud de entrenudos, el número de raíces y la longitud de las mismas, diámetro del tallo, la coloración, número de brotes, (si el cultivo presenta esta característica), la masa fresca y seca. (Castillo, A. 2008).

Las características anatómicas y fisiológicas de las plantas micro propagadas hacen necesaria para su supervivencia en condiciones ex vitro, una gradual adaptación o aclimatación a las condiciones medioambientales del invernadero o del campo.

La última fase del proceso de micro-propagación, llamada Fase 3, incluye los procesos de enraizamiento del micro-estaquilla obtenidas en la Fase 2 de multiplicación y su aclimatación a las condiciones ex vitro.

Es una práctica corriente realizar in vitro el enraizamiento del micro-estaquilla, pero esto produce problemas en muchas ocasiones. Así, Grout y Aston Hort. Res., 17, 1 (1977) observaron cómo tras el enraizamiento in vitro de sus plantas la zona de transición entre la raíz y el tallo era anormal, con

unas conexiones vasculares débiles y malformadas, lo que producía problemas en la absorción y circulación de agua desde las raíces al tallo. Esta disfunción se corrige, al menos parcialmente, tras una adecuada aclimatación. En otras ocasiones el problema estriba en que las raíces que crecen en agar son defectuosas, carecen de pelos radicales y suelen necrosarse al trasplantar las plántulas, lo que provoca una parada en el crecimiento de la planta. También se ha observado como las raíces formadas *in vitro* eran gruesas y con pelos radicales engrosados y anormales, siendo sus sistemas vasculares anómalos, en comparación con raíces formadas en un sustrato arenoso. En las raíces que no mueren durante el proceso de trasplante se producen nuevas raíces laterales y adventicias normales durante el proceso de aclimatación y estas ya crecen activamente. Por ello la relación raíz - tallo siempre es más alta en plantas enraizadas *ex vitro* que *in vitro*.

Todos estos factores hacen que muchos de los laboratorios que trabajan produciendo plantas *in vitro*, no realicen el enraizamiento de las micro-estaquillas *in vitro*, al resultar problemático, difícil y caro, ya que el proceso de enraizamiento *in vitro* se estima que implica un costo de entre el 35-75% del coste total de la micro-propagación. Por supuesto, no es posible generalizar, ya que la elección del método de enraizamiento va a depender totalmente de la especie y de sus características: porcentajes de enraizamiento y supervivencia final, que varían enormemente de unas especies a otras. Así, cuando el enraizamiento y aclimatación se pueden realizar simultáneamente, sin que haya demasiada pérdida de plantas, tanto los costes como la eficiencia de la producción se ven muy favorecidos.

Entre los factores a considerar en el enraizamiento de micro-estaquillas tanto *in vitro* como *ex vitro* están el tamaño del micro-estaquilla, su cobertura foliar, los reguladores de crecimiento utilizados en la inducción, y las condiciones medioambientales de temperatura, luz y humedad.

Algunos autores, Welander, *Physiol. Plant.*, 1983; , han propuesto una técnica híbrida, que combina las ventajas del enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*. Para ello el micro-estaquilla son incubadas inicialmente en un medio estéril que incluye hormonas para la inducción de raíces y azúcares, durante un periodo de 3 a 7 días, para la inducción-inicio de las raíces. Esto se puede hacer en un medio sólido o líquido normalmente en oscuridad. Luego el material es repicado en un medio no estéril, o incluso trasplantado a tierra, para la fase de elongación y desarrollo de las raíces, mejorándose de esta forma en muchos casos el resultado final de aclimatación y supervivencia.

Otros autores Driver y Shurtle, 1987, proponen realizar el enraizamiento y la aclimatación simultáneamente, trasplantando las micro-estaquillas directamente en el campo, después de una etapa previa de endurecimiento *in vitro*: tras la inducción del enraizamiento, las plantas aún en

condiciones in vitro eran sometidas a una elevada intensidad luminosa, un fotoperiodo más corto y una temperatura inferior a la normal, durante un par de semanas. Esto favorecía la lignificación y el desarrollo cuticular y estomático del material y permitía su trasplante directo al campo en condiciones controladas de humedad, luz y nutrientes (Mini túnel).

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido in vitro y por lo tanto sólo han estado expuestas a un microambiente escogido por ofrecer unas condiciones mínimas de estrés y cuasi óptimas condiciones para la multiplicación de las plantas, se adapten a condiciones ex vitro donde las condiciones no son asépticas, ni la luz, temperatura y humedad están controladas, y donde el crecimiento a ser autotrófico y no heterotrófico como in vitro. Es pues necesario reconstruir y desarrollar los sistemas que por adaptación a la condiciones in vitro, es el caso de la lignificación, cubiertas cuticulares, estomas y estructuras fotosintéticas.

Todas estas deficiencias o disfunciones provocadas por o durante la incubación in vitro es necesario corregirlas de forma gradual, e incluso como ya hemos citado comenzar la adaptación en condiciones in vitro, incluso induciendo fotoautotrofia in vitro mediante incrementos de la tasa de CO₂ y de irradiación en los contenedores de cultivo, al objeto de mejorar la calidad de la planta, los niveles de producción y los costes del proceso de micropropagación. (López C. es Colaborador Científico en la E.E. La Mayora (CSIC).

b) Tipo de sustrato

En el cultivo se han utilizado sustratos que sirve principalmente de soporte a las plantas, el sustrato debe suministrar a las raíces el agua necesaria para el desarrollo de la planta, y el aire suficiente para la respiración de las raíces, así como para la toma de nutrientes, de ahí la importancia para mantener un equilibrio entre la cantidad de agua y aire disponibles.

La elección de un sustrato con buenas características físicas, es indispensable para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, se debe elegir un sustrato suelto, poroso, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces, los sustratos se pueden utilizar solos o combinados. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a las especies en la que se está trabajando. (Morales et al 2013).

Es posible probar sustratos de origen natural que abundan en diferentes zonas, entre ellos pueden citarse la arena de río, arena de cuarzo, piedra pómez, gravilla, grava, cascarilla de arroz, residuos

de ladrillos, trozos de carbón mineral, cachaza, compost, humus de lombriz, zeolita, estiércol vacuno, turba, entre otros, y sus combinaciones, pero no siempre se conoce el efecto sobre las plantas, de ahí la necesidad de realizar evaluaciones que permitan la selección adecuada de los mismos en función de las variables de crecimiento y desarrollo que deben analizarse.

En esta fase de adaptación, las plantas deben volverse autótrofas, tienen que desarrollar raíces, brotes funcionales y aumentar su resistencia a la deshidratación y al ataque de organismos patógenos.

Las plántulas de boniato *Ipomoea batatas* (Lin.) Lam., obtenidas por vías biotecnológicas son muy sensibles a cualquier cambio que ocurra al concluir su desarrollo *in vitro*, por lo que requieren de una etapa de endurecimiento o aclimatación antes de ser plantadas en condiciones de campo. En este trabajo se utilizaron vitroplantas con el sistema radical bien desarrollado de la variedad CEMSA 78-354, procedentes de la micropropagación en medio MS modificado con 10 mg/L de ácido giberélico (AG3), que fueron sembradas en cepellones con cuatro tipos de sustratos, para su aclimatación. Se analizó el comportamiento de la altura y número de nudos, así como el número, ancho y largo de las hojas, a los 15, 25 y 30 días de sembradas. Se utilizaron 10 réplicas por tratamiento.

Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorizado balanceado y prueba de Duncan al 5 % de significación. Las vitroplantas se adaptaron con más eficiencia en el sustrato que contenía 25 % de suelo, 25 % de cascarilla de arroz y 50 % de cachaza. Las plantas se sembraron en la periferia de un organopónico, donde presentaron un 100 % de supervivencia y la emisión de tubérculos bien desarrollados. (Rodríguez A. J et al 2006).

En la aclimatación de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L) Burm. f.), que es el paso de las vitroplantas del ambiente *in vitro* a condiciones *ex vitro*, es una fase crítica dentro de la micropropagación y es el sustrato un factor a considerar en esta etapa, dada su influencia en la arquitectura del sistema radicular de las plantas. Por estas razones se evaluó el efecto de dos fuentes de materia orgánica de disponibilidad local (humus de lombriz y abono de río) en el sustrato para la aclimatación de vitroplantas de zábila. Después de 45 días fue posible aclimatar las vitroplantas de zábila en los sustratos probados, sin embargo, los mayores valores ($P < 0,05$) en porcentaje de materia seca de hojas (1,80%), número de hojas (7,36) y altura de planta (10,87 cm) se lograron al utilizar humus de lombriz.

La aclimatación de vitroplantas de zábila se realizó exitosamente en los sustratos probados, sin embargo los mayores valores en porcentaje de materia seca de hojas, número de hojas y altura de

plantas se logran al utilizar humus de lombriz como materia orgánica del sustrato. (Vilchez J., et al 2007).

El empleo de compost maduro durante la etapa de aclimatación de vitroplantas de banano clon “Gran Enano” (*Musa AAA*), obtenidas por micropropagación, durante la etapa de aclimatación, fue estudiado. Utilizando diversas proporciones suelo – compost (100 -0%, 90- 10%, 80-20%, 70-30%, 60-40%), un diseño completamente al azar fue establecido. Durante los 56 días que duró el estudio, se midió altura de las plantas, número de hojas, perímetro del tallo, área de la 3ª hoja, volumen de raíz, actividad de peroxidasa y catalasa (hoja y raíz) y colonización. En el sustrato de siembra se midió la actividad de esterases e invertasas. Las plantas cultivadas en el sustrato 90% - 10%, suelo-compost mostraron las mejores características morfológicas. El desarrollo de las plantas fue inhibido en los sustratos con más de 30% de compost (posiblemente un efecto de fitotoxicidad). Por las características químicas de los sustratos de siembra, se piensa que el contenido de sales en ellos pudiera ser el factor que limitó el desarrollo de las plantas.

La adición de compost al suelo puede funcionar como coadyuvante del desarrollo de plántulas de banano micro propagadas siempre y cuando se emplee en una relación no mayor al 20%. Bajo la condición anterior, las plántulas presentan mejores características morfológicas, comparadas con las plántulas que se desarrollan exclusivamente en suelo. El efecto inhibitor o de fitotoxicidad observado en los sustratos de siembra con composta en proporción igual o superior al 30% estuvo correlacionado con el contenido de sales (K^+). (Anaya A M. et al 2013).

La transferencia de plántulas de mora (*Rubus glaucus*) de condiciones in vitro a ex vitro es una de las fases más críticas de la técnica de micropropagación debido al alto grado de mortalidad de plántulas (50 a 90%), como consecuencia de una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales y un sistema radicular débil que facilita la deshidratación por estrés hídrico. Esta investigación se orientó a la obtención de plántulas limpias procedentes de cultivo de tejidos y endurecidas con micorrizas arbusculares (HMA).

La investigación se realizó bajo condiciones controladas; se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con ocho tratamientos, tres repeticiones y cuatro unidades experimentales, así: tres tratamientos testigo sin inoculación, sin fertilizar (T0), con 50% de fertilización (T50), y con 100% de fertilización (T100), y cinco tratamientos inoculados con HMA (MA1, MA2, MA3, MA4 y Mycobiol) más T50. Los mayores beneficios de la inoculación con HMA se lograron con la cepa MA4 aislada de *Silvania* (Cundinamarca) y con esporas nativas clasificadas como *Glomus* sp.

yAcaulosporasp. Las plantas inoculadas mostraron mejor adaptación al ambiente, expresada en el porte, la acumulación de biomasa foliar y radicular, mayor área foliar y mejor estado nutricional expresado en una mayor absorción de nutrientes esenciales (P, N, Ca y Mg). El uso de la cepa MA4 permitió sustituir el 50% de la fertilización comercial debido a que obtuvo valores similares a T100 en la absorción de P y Ca, y superiores a ésta en la absorción de N y Mg. Este comportamiento vegetal se explicó por los niveles de colonización del hongo en las raíces. (Roveda G. et al, 2007).

c) Áreas y espacios para la aclimatación

Plantas en invernadero (área de aclimatación) Los invernaderos para la aclimatación de plantas in vitro, generalmente cuenta con dos áreas de aclimatación: la primera, llamada propagación tiene una temperatura entre 28–30 °C y humedad relativa entre 50-80 %, el sistema de riego debe ser mediante un sistema computarizado de nebulizadores con una frecuencia de 3 segundos cada 5 minutos. La segunda, llamada área de aclimatación tiene una temperatura de 25-28 °C y humedad relativa entre 40-60 %, el sistema de riego en esta área es por micro aspersores. Para la presente investigación se creó una tercera área dentro del invernadero, llamada túnel con temperaturas entre 29-31 °C y humedad relativa del 99 % con un sistema de riego manual a través de bomba de mochila cada 5 minutos con el fin de mantener la alta humedad relativa.

d) Otros factores a considerar

El suministro de agua mediante el riego que se establezca, el control oportuno de plagas y/o enfermedades que se puedan presentar, así como el empleo de fertilización durante las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo son factores que no se pueden desconocer.

La interacción del sustrato y la fertilización tiene un efecto significativo en el incremento del área foliar y el volumen de raíz de las plantas, estas mostraron mayor expresión en área foliar fueron las establecidas en los sustratos de perlita: turba en las relaciones 1:0 y 3:1, con dosis de fertilización de 50 y 100% de la formulación de Steiner. En el caso del volumen de raíz, el sustrato de relación 3:1 interaccionó favorablemente con la fertilización al 50 y 100%. Así, los resultados indican que las plantas con mayor expresión de área foliar y volumen de raíz fueron aquellas en el sustrato de 75% de perlita y 25% de turba con una dosis de fertilización del 100%. Aunque no se presentaron diferencias significativas en la interacción de sustrato y fertirriego en relación a altura de planta, número de hojas y diámetro de tallo, los valores máximos se observaron siempre con la aplicación

del 50 o 100% de la fertilización. En general, en la acumulación de peso seco foliar, tallos y raíz no se determinó un efecto significativo de la interacción de las mezclas de sustratos con las fertilizaciones evaluadas. En estudios revisados, afirma que la producción de materia seca, particularmente durante la fase vegetativa de crecimiento, es una función lineal de la cantidad de la radiación interceptada, y que los factores como la nutrición y la condición hídrica de la planta tienen gran efecto en el rendimiento al alterar el índice del área foliar y en consecuencia la intercepción de luz. (Ramírez L, et al . 2010).

La luz y la respuesta morfológica de las plantas, las condiciones ambientales, como la humedad relativa, temperatura y la luz, comúnmente influyen el crecimiento y desarrollo de las plantas. La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos in vitro. Entre estos factores, la calidad espectral de la luz afecta a la elongación del tallo, ramificación lateral, la extensión de la hoja y la pigmentación (Wook et al. 2006). Los aspectos relacionados con la luz que son importantes en los cultivos in vitro son:

- La Intensidad de la luz: La irradiación puede ser expresada en función de la energía por unidad de superficie W/m^2 .
- La calidad de la luz: El espectro. Los tubos fluorescentes son la fuente de luz más usada en las cámaras de cultivo, aunque últimamente se han adicionado nuevas tecnologías.
- El fotoperíodo: Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta.

De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado in vitro puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperíodo in vivo será también el mejor fotoperíodo in vitro . Como ya se mencionó composición espectral de la luz, la dirección incidente y el tiempo de duración diaria (fotoperíodo) (Wassink ,Stolwijk, 2009), son aspectos del ambiente lumínico que son percibidas como señales por las plantas. Por ejemplo, en ambientes sombríos existe una mayor abundancia del espectro rojo lejano (RL) y en ambientes abiertos mayor proporción de luz roja (R). La relación R/RL puede regular la germinación en algunas semillas fenómeno conocido como

fotoblastismo (Figuroa J A, 2002). También durante el día y en presencia de otra vegetación circundante la proporción R/RL varía sobre las plantas, ésta información entrega señales que les permiten adecuar su crecimiento y arquitectura de copa (Azcón-B, J. 2000). Entre los parámetros morfológicos de las plantas, que experimentan variación ante cambios en el ambiente lumínico se puede mencionar la variación en:

- Área foliar específica (SLA)
- Largo de entrenudos
- Número de capas de parénquima empalizada
- Incremento del ángulo de las hojas.

Una alta intensidad lumínica provoca fotooxidación que implica la destrucción de la clorofila y disminución sostenida de la capacidad fotosintética, fenómeno conocido como fotoinhibición, lo que resulta en menos producción de biomasa. Además, la alta intensidad lumínica es perjudicial para el fotosistema II (PSII), dando lugar al daño foto oxidativo del centro de reacción. La frecuencia de este daño es relativamente alta cuando la intensidad de la luz se incrementa, especialmente cuando se combina con otros factores ambientales de estrés. Cabe destacar que a mayor intensidad de la luz, el costo en términos de consumo de energía eléctrica será mayor, por ende, la adecuada intensidad de la luz y el fotoperiodo dará el mejor producto con coste económico.

Un estudio realizado con vitroplantas de *Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst), señala que la mortalidad de las vitroplantas se debió principalmente a problemas derivados de malas prácticas en el manejo de las bandejas. Los cuales debilitaron a las plantas y potenciaron en el invernadero donde las condiciones ambientales de campo jugaron en contra.

El tratamiento B (Aumento diario FFF* ($\mu\text{mol.m}^2 \text{.s}^{-1}$) = 8, Días de duración = 16, Intensidad final ($\mu\text{mol.m}^2 \text{.s}^{-1}$) = 180), mostró mejores incrementos en su área foliar al finalizar el ensayo, sin embargo ninguna bandeja mantuvo una constante de crecimiento. Quizás el acotado tiempo de estadía por invernadero y, en general, del ensayo no ayudó a obtener resultados más precisos y reales.

La gradualidad en que la intensidad lumínica del tratamiento B fue trabajada mostró mejores alturas que el tratamiento A (Aumento diario FFF* ($\mu\text{mol.m}^2 \text{.s}^{-1}$) = 16, Días de duración = 10, Intensidad final ($\mu\text{mol.m}^2 \text{.s}^{-1}$) = 180), la agresividad en intensidad y tiempo de la bandeja A (10 días) nunca arrojó alturas superiores a la bandeja B, por ende, la mejor elección es aumentar la intensidad cada 8 $\mu\text{mol.m}^2 \text{.s}^{-1}$ por 20 días. El ensayo se consideró exitoso, ya que se logra distinguir empíricamente la mejor tasa de incremento lumínico para la aclimatación de *Nothofagus alpina*, pero para experimentos futuros, sería beneficioso que ambos grupos de microplantas sean desde el inicio tratados con luces LEDs y se puedan comparar con luz fluorescente como testigo. Esto proporcionó una manera más fácil de determinar qué grupo de plantas tiene un mejor crecimiento más general. También sería favorable aprovechar las luces LEDs roja y azul ya que tienen mayores efectos sobre el crecimiento de las plantas, así se podrían comparar diferentes intensidades lumínicas con diferentes tipos de luces. Esto concluye que las luces LEDs se pueden utilizar como un sustituto eficaz por los tubos fluorescentes usados en la aclimatación in vitro de *Nothofagus alpina*, debido a que los LEDs consumen menos energía, tienen mayor durabilidad, emiten menos temperatura. (Astudillo C., 2014).

La intensidad de la luz solar, la humedad relativa que se mantiene en los invernaderos son de extrema importancia. Como se ha expuesto resulta imprescindible el control y monitoreo de todos los factores antes mencionados para las condiciones edafo-climáticas en que se desarrollará la fase de climatización de las vitroplantas. Algunas de las técnicas utilizadas para modificar el ambiente externo son la reducción paulatina de la humedad relativa y el aumento gradual en la luminosidad. (Morales, 2013).

Para normalizar la actividad fisiológica se recomienda el uso de antitranspirantes, para reducir así la pérdida de agua de las plantas, la adición de osmoreguladores y de retardadores de crecimiento, principalmente del grupo de los triazoles -como el paclobutazol que bloquean la síntesis de giberelinas y aumentan la resistencia al estrés por factores bióticos, esto aparentemente asociado a un incremento de antioxidantes en la planta, (Torres 2010).

Del total de 30 vitroplantas de *C. chinense* que fueron transferidas al invernadero para la fase de aclimatación, se logró un 73.33% de sobrevivencia después de dos semanas en invernadero. Estos resultados son similares a los observados por Christopher y Rajam (1994), quienes lograron un 86% de sobrevivencia al trabajar con dos especies de *Capsicum*. Dabauza y Peña (2001); obtuvieron 90 y 95% de sobrevivencia en *C. annum* L. El 36.67% de mortalidad obtenido durante la aclimatación

lo atribuimos a las plantas que fueron plantadas con menos de 4 foliolos, los cuales no resistieron el estrés causado por el cambio de temperatura y por consiguiente murieron; mientras que las plantas que fueron plantadas con 4 a 8 foliolos presentaron una alta sobrevivencia. Otro factor que influyó fue la presencia de hongos (Damping-off) en la etapa de trasplante.

También se requiere prestar atención al momento del trasplante y cubrir solamente la base del tallo ya que si se cubre el primer entrenudo aumenta la mortalidad. A B 54 Las plantas que lograron sobrevivir presentaron un lento desarrollo en la primera semana de trasplante; pero en el transcurso de la tercera semana se apreció el desarrollo de nuevos folios, y los 45 días se pudo observar la formación de yemas florales. El desarrollo de frutos se dio a los 60 días de cultivo en el invernadero, los cuales estaban listos para su cosecha al cabo de 98 días. El ciclo vegetativo de las plantas fue muy similar a las plantas procedentes de semilla. Es importante señalar que todas las plantas fueron colocadas bajo sombra de Saran en el invernadero y no en cámaras húmedas de aclimatación como se acostumbra hacer con la mayoría de las plantas que son aclimatadas en el invernadero. Esta información resulta importante ya que simplifica la manipulación de las vitroplantas durante la transferencia a invernadero, reduce el tiempo de cultivo en esta fase y facilita la transferencia de plantas a campo.

Se ha realizado un estudio en el que las plántulas de *Laeliaeyermaniana* RCHB para aclimatación, se subcultivaron en el medio MS, hasta que presentaron dos o más hojas y raíces. Con base en los criterios sugeridos por Rawson y Gómez (2001), las plántulas se clasificaron en: grandes (mayores de 3 cm, con dos o más hojas y raíces), medianas (1.5 a 3 cm; 1 a 2 hojas y raíces) y pequeñas (menores 1.5 cm con una hoja y raíz). Posteriormente se transfirieron a macetas de plástico de 6.7 cm de altura y 6.0 cm de ancho, utilizando como sustrato fibra de palma soyate (*Braheadulcis* (H.B.K.) (Nava F JJ, et al, 2011).

Las macetas se colocaron en charolas con domo transparente y se expusieron a un ambiente controlado [temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16/8 hr. de oscuridad y $46 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa (Quantum Meter ApogeeMod. QMSWSS)]. Cada 15 días el domo se fue abriendo de manera paulatina hasta que las plántulas quedaron completamente expuestas, lo cual ocurrió a los 45 días. Permanecieron bajo las mismas condiciones hasta completar 90 días de cultivo. El porcentaje de sobrevivencia se obtuvo al multiplicar el número de plantas que sobrevivieron al final del periodo de aclimatación por 100, dividiendo el resultado entre el número

inicial de plántulas sometidas a este proceso. Por otro lado, se cuantificó el número de estomas por mm² en la región abaxial y adaxial en hojas de plantas in vitro, y a los 90 días de aclimatadas. (Nava F J, Jet al, 2011)

Conclusiones

Del marco teórico y conceptual analizado, se puede deducir que son múltiples los factores a considerar para lograr la tecnología de producción de vitroplantas, ya que no es suficiente con la propagación de las mismas en el laboratorio; el verdadero reto consiste en la implementación de un manejo adecuado donde se logren altas tasas de sobrevivencia en la fase de aclimatación minimizando los costos de producción.

La implementación de una adecuada estrategia (técnica) durante la fase de aclimatación, permite utilizar el mismo espacio de las viviendas, lo que permitirá cultivar mayor número de veces en el año. La aplicación de reguladores de crecimiento en combinación con aportes de nutrientes por la vía foliar puede jugar este papel. De otra parte, como resultado de las investigaciones revisadas, ha sido demostrada la factibilidad de producir plantas de mejor calidad, a precios competitivos en el mercado, para satisfacer la creciente demanda de material de plantación con alto valor sanitario y genético, donde siempre está presente como objetivo fundamental el de cumplir con las exigencias del cliente y que se logre la competitividad que demanda el mercado.

La recopilación sintetizada de investigaciones realizadas sobre Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero, que se han plasmado en este trabajo nos ha permitido ampliar el conocimiento, llevar a la práctica y obtener mejores resultados en la propagación de plantas a través de la técnica in vitro, fundamentalmente en la fase de aclimatación, comprendiendo que esta concluye con un análisis anatómico y fisiológico de las plantas obtenidas en laboratorio.

Referencias Bibliográficas

AZCÓN, B., J; TALÓN M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal; ed. Universidad de Barcelona. España, editorial Mcgraw-Hill interamericana de España, S.A.U. 522 p. ISBN: 978-84-481-5168- Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=556962>

ASTUDILLO C. 2014 Tasa de incremento lumínico óptimo durante la aclimatación in vitro de *Nothofagus alpina* (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)), Valdivia-Chile. Disponible en : cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/fift153t/doc/fift153t.pdf

ARAGÓN, C., et al 2006. Importancia metabólica del almidón en la aclimatación de plantas de plátano ‘CEMSA ¾’ (AAB). *InfoMusa* 15(1-2):32-53. ISBN-10: 1729-0996. Disponible en : <http://www.bioversityinternational.org/e-library/publications/detail/infomusa-la-revista-internacional-sobre-bananos-y-platanos-8/>

ANAYA, A M L., et al 2013 Uso de compost durante la etapa de aclimatación de vitroplantas de banano clon “Gran Enano” (*Musa AAA*) Centro de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas 2013. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/273446856_Uso_de_compost_durante_la_etapa_de_aclimatacion_de_vitroplantas_de_banano_clon_Gran_Enano_Musa_AAA

CHAVANNE, E. R.; J. GIARDINA Y A. NOGUERA. 2008. Producción de caña semilla de alta calidad en el semillero básico de vitroplantas durante las campañas 2001–2007. Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar, 15, Tucumán, Argentina. Disponible en : <http://www.eeaoc.org.ar/upload/contenido/pdf/20120322191608000000.pdf>

CAPELLADES M , R. FONTARNAU, C. CARULLA, AND P. DEBERGH .1990. Environment Influences Anatomy of Stomata and Epidermal Cells in Tissue-cultured *Rosa multiflora*. J. AMER. Soc. HORT. SCI. 115(1):141-145. 1990. Disponible en : <http://journal.ashspublications.org/content/115/1/141.full.pdf>

CASTILLO, A. 2008. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay:AR-VITRO,INIA,8p.S.Disponible en : <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>

DOMÍNGUEZ R. et al,. 2008. El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Universidad y Ciencia* 41, (53-62),

mayo-agosto. Universidad autónoma de Aguas Calientes. Disponible en : <http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista41/Articulo%208.pdf>

FIGUEROA, J. A., VÁSQUEZ-YANES, C. 2002. Efecto de la calidad de luz sobre la germinación de semillas en el árbol pionero tropical *Heliocarpus appendiculatus* (Tiliaceae). *Revista de Biología Tropical*. 50 (1): 1-6. ISSN: 2215-2075. Disponible en : http://www.ots.ac.cr/rbt/attachments/volumes/vol50-1/04-Figueroa_Efecto.pdf

FLORES, D; ., et al, 2011. Enraizamiento de mora (*Rubus adenotrichus*) en medio líquido en el sistema de inmersión temporal y su aclimatación en invernadero. *Tecnología en Marcha*. Vol. 25, (2). 2011, pp 3-9. ISSN: 2215-3241. Disponible en : http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/300

IZQUIERDO, H et al. 2009 Influencia de un oligogalacturónido en la aclimatización de vitroplantas de banano (*Musa spp.*) del clon FHIA-18 (AAAB). *cultrop* , 30, (1) , pp. 00-00 . ISSN 0258-5936. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362009000100005&lng=es&nrm=iso>..

KESSEL, A. 2008 Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies .29, (3) , pp. 27-37. ISSN 0258-5936. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000300005&lng=es&nrm=iso>..

MORALES, 2013. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Pp 71-94. Disponible en : http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-009-2075-0_5#page-1

MROGINSKI, L., P., Y FLASCHLAND, E. 2010. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. Disponible en: www.Biblioteca.org.ar/libros/150405.pdf

NOÉ N, L. BONINI. 1996 Leaf anatomy of high bush blueberry grown in vitro and during acclimatization ex vitro conditions. *Biología Plantarum*. 38, pp 19-25. ISSN : 1573-8264 Disponible en : <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02879626>

NAVA F. J. J, et al. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laeliaeyermanianarchb. F. Generadas in vitro*. 32 pp 107-117 Polibotanica ISSN: 1405-2768 . Disponible en : <http://www.redalyc.org/pdf/621/62119933006.pdf>

ORTIZ, R. , et al 2000. Factores que afectan el desarrollo de vitroplantas de Caña de Azúcar en la fase adaptativa. Ediciones INCA ISBN: 959-7023-12-1 Disponible en : http://ediciones.inca.edu.cu/files/folletos/factores_afectan.pdf

PEDRAZA-S, M., D. et al 2001. Crecimiento y nutrición de microplantas de gerbera inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. *Agrociencia* 35 (2), pp 149-158. ISSN: 1405-3195. Disponible en : <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30235203>

RAMÍREZ L, et al, . 2010. Efecto del sustrato y fertirriego en el crecimiento inicial de vitro-plantas de *Musa sp. cv. Roatán*. *Naturaleza y Desarrollo* 8 (2).ISSN : 2007-204X Disponible en : http://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol8num2/NatyDes_Vol-8-2-Art3.pdf

RODRÍGUEZ A J, et al 2006. Aclimatización de vitroplantas de boniato *ipomoea batatas (Lin.) Lam.* En diferentes sustratos y su adaptación a Condiciones de campo. *Agrotecnia*. 5 Disponible en : http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2006-1/agrotec1-2006.html

ROVEDA G, et al , 2007. Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de micoplántulas de mora (*Rubusglaucus*). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1), 28-36. ISSN: 0122-8706 . Disponible en : <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/download/80/80>

SOSA-RODRIGUEZ, F. M. et al. 2009 Propagación in vitro de *Heliconia standley Macbride* en Cuba. *Rev. Chapingo Ser.Hortic* ,15, (spe). , pp.17-23. ISSN 2007-4034. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000400004&lng=es&nrm=iso)

[152X2009000400004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000400004&lng=es&nrm=iso). TORREJÓN G., DONAYRE M., 2006. Aclimatación de *Uncaria tomentosa (Willd.) DC.* producida in vitro. *Ecología Aplicada* versión impresa ISSN 1726-2216 *Ecol. apl.* v.5 n.1- Lima dic. 2006

TRUJILLO, D, 2008. Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). Tesis (B.S. en Biotecnología), Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales; Quito, Ecuador.

TORRES , MOGOLLÓN 2002. Efecto del PBZ sobre la brotación y desarrollo in vitro de la epidermis foliar de *cattleya mossiae* Parker ex hooker previo a la aclimatización. *BIOAGRO. (29) Naturaleza y Desarrollo* 8 (2), 2010. ISSN: 1316-3361 Disponible en : <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714104>

TORRES P M.L et al. 2010 Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) Avances en Ciencias e ingenierías . Disponible en : http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo_de_contenidos/Documents/volumen_2/Avances_2010_vol2_B9-B15.pdf

VILCHEZ, J. et al. 2007. .Aclimatización de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f): efectos del sustrato *1 Rev. Fav. Agron.* 24 Supl. 1: 57-61. Disponible en : http://revfacagronluz.org.ve/PDF/supl_mayo_2007/v24supl10.pdf

VIDOZ M L, et al 1999. Comportamiento ex vitro de Plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de Tres Híbridos Intergenéricos. *Ciencia y Técnica.* Disponible en : <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/agrarias/a-005.pdf>

WOOK, J., LEE, C., PAEK, K. 2006. Influence of Mixed LED Radiation on the Growth of Annual Plants. *Journal of Plant Biology.* 49(4): 286-290. Disponible en : <http://link.springer.com/article/10.1007/BF03031157>

WASSINK, E. C., STOLWIJK, J. A. J. 2009. Effects of light quality on plant growth. *Annual Reviews (AR).* Laboratory for Plant Physiological Research, Agricultural University, Wageningen, Netherlands. 29 p. Disponible en : <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.07.060156.002105?journalCode=arplant>.

1

