

CENTRO DE BIOPLANTAS
UNIVERSIDAD DE CIEGO DE AVILA

ACLIMATIZACIÓN DE PLANTULA DE CAÑA
DE AZÚCAR (*Saccharum* sp. híbrido)
PROPAGADAS EN BIORREACTORES DE
INMERSIÓN TEMPORAL.

Tesis Presentada en Opción al Grado Científico
de Doctor en Ciencias Agrícolas.

Autor: Romelio Rodríguez Sánchez.

Tutor: Dr. Justo L. González Olmedo

Ciego de Avila

2005

DEDICATORIA

A mi esposa e hijas, fuentes inagotables de inspiración para culminar el trabajo.

AGRADECIMIENTOS

No es posible hablar de la ejecución y desarrollo de un trabajo científico sin que en él este la participación de un conjunto de personas que de alguna forma hayan incidido en la culminación del mismo. A todos ellos les agradezco enormemente por su colaboración en la realización de este trabajo.

Agradezco también a mis compañeros del antiguo Laboratorio de Bioquímica donde se comenzó a realizar el mismo, así como a todos los colegas del Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos que han cooperado en su desarrollo final, en especial a la Ing. Mariela Cid, quien nos brindó su valioso apoyo en cada momento y de quien recibimos el material vegetal empleado en el trabajo.

Al Dr. Yves Desjardins, director del Centro de Investigación en Horticultura de la Universidad de Laval en Canadá, por facilitarnos la posibilidad de emplear sus equipos y laboratorios. Así como a la MSc. Nelly Vásquez del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CATIE en Costa Rica, quien colaboró en los cortes histológicos realizados.

Especial agradecimiento a mi tutor Dr. Justo Lorenzo González-Olmedo por estimularme cada día a seguir adentrándome más en este maravilloso mundo, brindarme su apoyo en los momentos difíciles y por guiarme en mi formación profesional durante tantos años.

A la Revolución Cubana por haberme permitido formarme como profesional.

Por último, mi eterna gratitud a mis padres y familiares por su valioso apoyo durante toda mi vida.

No puedo terminar sin antes agradecer a todos aquellos que con suma paciencia han leído el documento y colaborado en las críticas científicas del mismo.

SINTESIS.

Las plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) var. C91-301 micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT) sirvieron como material vegetal con el objetivo de incrementar la eficiencia biológica y estudiar los cambios morfo-fisiológicos y bioquímicos durante la fase de aclimatización. Se estudió la influencia de la calidad de las mismas en el momento de salida de la fase *in vitro*, diferentes sustratos e intensidades de flujo de fotones fotosintéticos sobre la supervivencia y el crecimiento. También se evaluó el comportamiento endógeno de la sacarosa, las enzimas involucradas en el metabolismo del carbono y la capacidad fotosintética durante todo el proceso. Los mejores porcentajes de supervivencia (>90%) se lograron con las categorías de plántulas con masa fresca superior a 0,31 g plantadas en turba a $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 90% humedad relativa (HR). Cuando se empleó una mezcla de cachaza + ceniza (1:1, v:v) como sustrato, con $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 90% HR, también se lograron resultados favorables en el porcentaje de supervivencia (87%). Se demostró el efecto positivo que ejercen los incrementos de la intensidad lumínica ($2\ 000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y la reducción de la humedad relativa (80%) sobre variables de crecimiento (masa fresca, número de hojas e hijos). Desde el momento de ser transferidas las plántulas a condiciones de aclimatización, cada siete y hasta los 42 días, se evaluaron las variables masas fresca y seca, número de hojas, número de raíces, contenido de clorofilas, densidad estomática y área foliar. Las dinámicas del comportamiento de cada una de ellas, ratificaron el criterio del empleo creciente de la luz y la disminución gradual de la humedad relativa, como un manejo eficiente durante este proceso, dado primeramente por el porcentaje de supervivencia superior a 95% y por los incrementos en las variables de crecimiento, mientras que en los contenidos de clorofilas se observó una disminución durante la aclimatización. Los niveles de sacarosa endógena y las enzimas involucradas en su metabolismo tuvieron un comportamiento acorde a las diferentes situaciones ambientales y al desarrollo de las plántulas en cada momento. En los primeros siete días, se consumió sacarosa acumulada *in vitro*, luego los niveles originales se recuperaron por biosíntesis y continuaron incrementándose bajo las condiciones de mayor FFF y menor HR. La actividad fotosintética se incrementó desde su salida de las condiciones *in vitro*, lo que está en correspondencia con el desarrollo fisiológico alcanzado por las plántulas, mientras que la transpiración se redujo. Todo lo antes expuesto demuestra por que la metodología propuesta en este trabajo logra buena eficiencia, con altos porcentajes de supervivencia y crecimiento de las plántulas, que permite su traslado a campo en 42 días.

INDICE

	Pá g.
1.0. INTRODUCCIÓN	1
2.0. REVISION BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. El cultivo de la Caña de Azúcar.	4
2.2. Sistemas de propagación.	4
2.2.1. <i>Micropropagación de la Caña de Azúcar.</i>	6
2.2.1.1. <i>Empleo de los Biorreactores de Inmersión Temporal.</i>	6
2.3. Características morfo-fisiológicas de las plántulas en condiciones <i>in vitro</i>.	7
2.3.1. <i>El tallo y las raíces</i>	7
2.3.2. <i>Cutícula, estomas y mesófilo de la hoja.</i>	8
2.3.3. <i>El Potencial hídrico, la conductancia estomática y la tasa de transpiración.</i>	10
2.4. Hiperhidricidad.	11
2.5. Fotosíntesis.	11
2.5.1. <i>Estructura del cloroplasto y contenido de clorofila.</i>	13
2.6. Manejo de las condiciones ecofisiológicas <i>in vitro</i> y su efecto en el desarrollo de las plántulas.	14
2.7. Aclimatización <i>ex vitro</i>.	18
2.7.1. <i>Principales componentes empleados en la elaboración de sustratos.</i>	21
2.7.2. <i>Manipulación de la luz en las casas de cultivo.</i>	23
2.7.3. <i>Manejo de la humedad relativa.</i>	24
2.7.4. <i>Control fitosanitario.</i>	25
2.7.5. <i>Empleo de reguladores del crecimiento.</i>	26

3.0.	MATERIALES Y MÉTODOS.	28
3.1.	Efecto de la calidad de las plántulas en el momento de salida de las condiciones <i>in vitro</i> a las <i>ex vitro</i>.	28
3.2.	Efecto del tipo de sustrato en la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.	30
3.3.	Efecto del flujo de fotones fotosintético sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.	32
3.4.	Efecto de la reducción de la humedad relativa y el incremento de los FFF sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.	33
3.5.	Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado a ambiente natural.	34
3.6.	Evaluación de las características morfo-fisiológicas de las plántulas durante la aclimatización.	34
3.6.1.	<i>Evaluación de indicadores morfológicos de la calidad de las plántulas.</i>	34
3.6.2.	<i>Comportamiento de la sacarosa y las principales enzimas involucradas en el metabolismo del carbono durante el proceso de aclimatización.</i>	36
3.7.	Comportamiento de la actividad fotosintética de las plántulas durante la aclimatización	38
3.7.1.	<i>Evaluación del comportamiento de la actividad fotosintética y la transpiración de las plántulas durante la aclimatización.</i>	38
3.7.2.	<i>Efecto de diferentes condiciones ambientales sobre variables del crecimiento y la actividad fotosintética de las plántulas.</i>	39
3.8.	Tratamiento estadístico de los datos.	41
4.0.	RESULTADOS Y DISCUSION.	42
4.1.	Efecto de la calidad de las plántula en el momento de salida de las condiciones <i>in vitro</i> a las <i>ex vitro</i>.	42
4.2.	Efecto del tipo de sustrato en la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.	46
4.3.	Efecto del flujo de fotones fotosintético en la supervivencia plántulas durante la aclimatización.	49
4.4.	Efecto de la reducción de la humedad relativa y el incremento de	53

	los FFF sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.	
4.5.	Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado a ambiente natural.	58
4.6.	Evaluación de las características morfo-fisiológicas de las plántulas durante la aclimatización.	60
4.6.1.	<i>Evaluación de indicadores morfológicos de la calidad de las plántulas.</i>	60
4.6.2.	<i>Comportamiento de la sacarosa y las principales enzimas involucradas en el metabolismo del carbono durante el proceso de aclimatización.</i>	76
4.7.	Comportamiento de la actividad fotosintética de las plántulas durante la aclimatización.	85
4.7.1.	<i>Evaluación del comportamiento de la actividad fotosintética y la transpiración de las plántulas durante la aclimatización.</i>	85
4.7.2.	<i>Efecto de diferentes condiciones ambientales sobre variables del crecimiento y la actividad fotosintética de las plántulas.</i>	92
5.0.	CONCLUSIONES.	96
6.0.	RECOMENDACIONES.	97
7.0.	BIBLIOGRAFIA.	98

1.0 INTRODUCCION.

La caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) generalmente se clasifica como un cultivo que crece en áreas tropicales y subtropicales. Los productos que más se obtienen de ella son: alimentos, fibras, bagazo, combustibles y electricidad (Clarke y Leslie, 1996).

Este cultivo ha sido el principal renglón de la producción agrícola en Cuba. Las condiciones desfavorables en que se desarrolló la agricultura cañera en los últimos años, provocaron que la producción se haya limitado considerablemente. No obstante a la reestructuración que se lleva a cabo en la agro-industria azucarera cubana, la aplicación de las técnicas biotecnológicas seguirá siendo una poderosa herramienta para alcanzar en corto tiempo grandes cantidades de plantas, para el fomento de nuevas variedades, ya sean introducidas al país u obtenidas mediante el programa nacional de mejoramiento genético,.

La necesidad de obtener semillas con alta calidad, pureza genética y libre de enfermedades en un tiempo relativamente corto, ha permitido la introducción de las técnicas de micropropagación en diferentes especies. Esto motivó que la producción masiva de plántulas en varios laboratorios comerciales, así como la ejecución de proyectos científicos que generen nuevos protocolos de cultivo *in vitro*, con el empleo de la organogénesis, donde se destacan las tecnologías basadas en el uso de biorreactores de inmersión temporal (Lorenzo, 1998; Escalona, 1999; Etienne *et al.*, 1999; Escalona *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2000; Etienne y Berthouly, 2002) y a través de embriogénesis somática (Castillo, 2001; Nieves *et al.*, 2003).

Lorenzo (1998) desarrolló un protocolo para la propagación de caña de azúcar por organogénesis con el empleo de biorreactores de inmersión temporal que revoluciona en gran medida las técnicas de micropropagación convencional empleadas en Cuba, ya que aumenta de forma significativa los coeficientes de multiplicación. La aplicación de este protocolo a escala productiva es de suma importancia para la rápida introducción de las nuevas variedades existentes y la renovación de las cepas con bajos rendimientos a escala comercial.

El empleo de este nuevo protocolo incentiva un mayor esfuerzo en el estudio de los aspectos relacionados con las características eco-fisiológicas de las plántulas en condiciones *in vitro* y durante la etapa de aclimatización, para así lograr que las mismas alcancen altos porcentajes de supervivencia y la calidad comercial en un tiempo relativamente corto en esta fase. A pesar de la gran producción de plantas en los laboratorios comerciales, la cifra que llega a los campos es baja por deficiencias en las metodologías precedentes de aclimatización, entre otras razones.

La metodología de aclimatización de plántulas de caña de azúcar que se comenzó a aplicar en los laboratorios comerciales cubanos desde 1994, ha presentado dificultades en los niveles de supervivencia, el sustrato empleado y el crecimiento de las plántulas. Por estas razones muchos laboratorios han buscado alternativas según sus posibilidades productivas y sus capacidades en las áreas *ex vitro*.

De la Fe *et al.* (1998) hicieron aportes a la metodología de aclimatización antes citada, al emplear bioestimulantes y biofertilizantes para aumentar el ritmo de crecimiento de las plántulas en esta fase. También se trabajó intensamente en el desarrollo de diferentes sustratos con vistas a aumentar la supervivencia y la calidad de las mismas (Ortiz, *et al.*, 1998 a,b), pero aún estas metodologías pueden ser mejoradas en algunos de sus componentes.

A pesar de los avances, en la aclimatización de la caña de azúcar no se han realizado estudios que profundicen sobre los efectos de las condiciones ambientales en los aspectos fisiológicos, anatomorfológicos y bioquímicos de las plántulas desde el momento de salida de las condiciones *in vitro* hasta la permanencia final en esta fase.

Por todo lo anteriormente planteado, se propone la siguiente **hipótesis** de trabajo:

» Es posible elevar la eficiencia en la aclimatización de plántulas de caña de azúcar provenientes de biorreactores de inmersión temporal, con el manejo adecuado de las condiciones ambientales y profundizando en los cambios fisiológicos, histológicos y bioquímicos de las plántulas.

Para validar esta hipótesis se desarrolló este trabajo que persigue cumplir los siguientes **objetivos**:

- è Manejar factores ambientales para elevar la eficiencia biológica en la aclimatización de plántulas de caña de azúcar propagadas en biorreactores de inmersión temporal.
- è Realizar la caracterización fisiológica, anatomorfológica y bioquímica de las plántulas de caña de azúcar provenientes de biorreactores de inmersión temporal durante la aclimatización.

Novedad Científica

Por vez primera se caracterizan los cambios fisiológicos, histológicos y bioquímicos de las plántulas de caña de azúcar provenientes de biorreactores de inmersión temporal durante su tránsito por la fase de aclimatización.

Valor Práctico

El establecimiento de las condiciones ambientales y de cultivo durante la aclimatización de plántulas de caña de azúcar que aumenta los niveles de supervivencia y calidad de las plántulas provenientes de biorreactores de inmersión temporal, así como la reducción del tiempo necesario para su siembra directa en campo.

2.0. REVISION BIBLIOGRÁFICA.

2.1. El cultivo de la Caña de Azúcar.

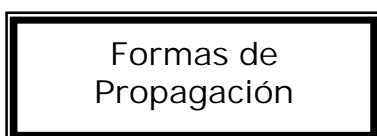
El género *Saccharum* pertenece a la familia Poaceae del orden Poales y la clase monocotiledónea. El origen de la caña de azúcar es aún en la actualidad, un tema polémico y controvertido, aunque se acepta en general que su origen es asiático. La caña de azúcar original (*Saccharum officinarum* L., 2n=80) probablemente es el producto de una larga evolución a partir de especies silvestres de *Saccharum spontaneum*, establecidas por años en Nueva Guinea y las islas vecinas. Las variedades actuales de la caña de azúcar son híbridos de diferentes especies del género *Saccharum* (Moore y Maretzki, 1999).

2.2. Sistemas de propagación.

En el cultivo de la caña de azúcar, la forma de propagación que se emplea a nivel comercial es la formación de estacas por seccionamiento del tallo. Este sistema de multiplicación tiene como principal deficiencia que el tallo que se siembra podría ser aprovechado también en el proceso productivo y aumentaría notablemente los rendimientos, además del empleo de grandes extensiones de terreno que se necesitan para fomentar los distintos bancos de semillas establecidos (Gálvez y Almeida, 1996).

A principios de la pasada década se estableció un sistema de categorización de semillas con las etapas conocidas como: semilla básica, semilla registrada y semilla certificada, ésta etapa final es para obtener las semillas que serán plantadas comercialmente. Las fases que la preceden son necesarias para reproducir las semillas en cantidades suficientes y con los requerimientos técnicos que se exigen. Estos pasos durarán más de 32 meses, lo que hace que la introducción de las nuevas variedades a escala productiva sea un proceso muy lento (Gálvez y Almeida, 1996).

En la actualidad se han encontrado vías alternativas de multiplicación de esta especie, las cuales han sido muy efectivas y por ello han permitido una rápida introducción de las nuevas variedades a escala comercial. En la figura 1 se muestran las diferentes formas de propagación de la caña de azúcar que hasta el presente se han desarrollado, según Ojeda y Vega (1999).



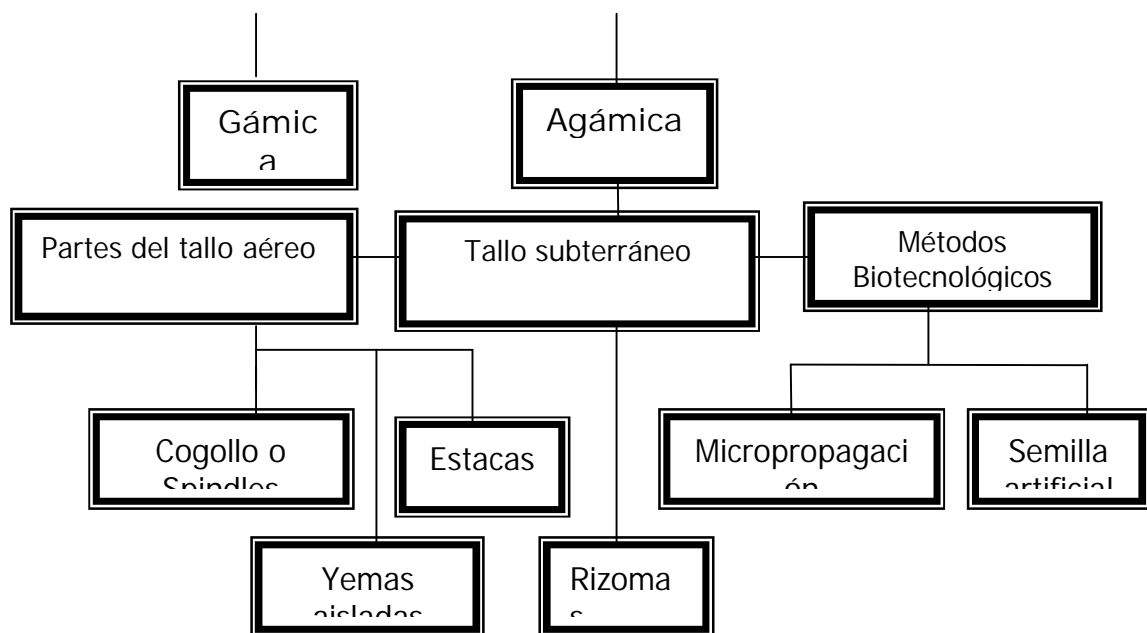


Figura 1. Esquema de las distintas formas de propagación de la caña de azúcar.

A pesar de las múltiples formas de propagación existentes, no ha sido posible mantener un flujo estable de renovación de las cepas envejecidas, lo que contribuyó, entre otras causas, a los bajos rendimientos agrícolas alcanzados en los últimos años en Cuba. Todos los métodos planteados presentan ventajas y desventajas, y al parecer no se cumple cabalmente con las tecnologías de propagación establecidas en cada uno, lo que trae consigo la ineficiencia de los mismos.

2.2.1. Micropropagación de la Caña de Azúcar.

La caña de azúcar es uno de los primeros cultivos donde se utilizaron las técnicas de cultivo de tejidos para producir semillas libres de enfermedades y de mejor calidad (Burner, 1992).

La micropropagación presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación vegetativa y su empleo se ha extendido a diversos cultivos hortícolas, agrícolas y forestales (Kozai, 1991; Jeong *et al.*, 1995). Sin embargo, a pesar de las ventajas que ésta ofrece, su uso a escala comercial en el mundo es todavía limitado debido a los costos de producción relativamente

altos, bajas tasas de multiplicación *in vitro* y pobre supervivencia durante la aclimatización (Kozai y Jeong, 1993; Kirdmanee *et al.*, 1995 a,b). En gran medida lo anterior se debe a las características del ambiente *in vitro*, que provocan aberraciones de la estructura y función de la planta (Kozai, 1991; Kirdmanee *et al.*, 1994; Desjardins, 1995; Jeong *et al.*, 1995; Ziv, 1995; Pospíšilová *et al.*, 1997).

En Cuba, la micropropagación se emplea a escala industrial en diferentes cultivos, dentro de los que se destaca la caña de azúcar (Jiménez, 1995). Esta técnica resulta de especial utilidad para acelerar la introducción de nuevos y promisorios cultivares en la producción agrícola (Santana *et al.*, 1996 a, Lorenzo *et al.*, 1998).

No obstante a los avances alcanzados en la micropropagación convencional en la última década, las investigaciones para establecer métodos de propagación masiva más eficientes, continúan en ejecución. Las que estudian el empleo de biorreactores de inmersión temporal son un ejemplo de ellas.

2.2.1.1. Empleo de los Biorreactores de Inmersión Temporal.

Debido a la gran demanda de semillas de caña de azúcar existente en Cuba, ya que los métodos de micropropagación convencional no satisfacen la misma, se ha establecido un nuevo protocolo de propagación masiva con el empleo de los biorreactores de inmersión temporal. Estos permiten la obtención de semillas de alta calidad en muy corto tiempo, ya que se alcanzan mayores coeficientes de multiplicación en dependencia de la variedad empleada, y se reducen los costos de producción (Lorenzo, 2000).

El empleo de medios líquidos en la propagación *in vitro* reduce la manipulación de las plántulas y simplifica las operaciones de cambio de medios (Etienne y Berthouly, 2002). La principal desventaja es que puede provocar la hiperhidratación de los tejidos cuando fallan algunos manejos de los componentes del protocolo. Este fenómeno es un severo desorden fisiológico, causado por la presencia de cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos, lo que incide notablemente en la aclimatización de las plántulas (Ziv, 1995).

La aplicación de los nuevos protocolos en BIT a distintas especies, tanto agrícolas como ornamentales han permitido una mayor eficiencia productiva, pero aún son limitados los estudios que profundicen en el efecto del ambiente *in vitro* como *ex vitro* sobre variables anatomorfológicas y fisiológicas de las plántulas.

2.3. Características morfo-fisiológicas de las plántulas en condiciones *in vitro*.

Como resultado del ambiente *in vitro*, las plantas desarrollan una anatomía y fisiología diferentes a las que son cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo (Kozai y Smith, 1995; Pospíšilová *et al.*, 1997; Majada *et al.*, 2000; Majada *et al.*, 2001). Los desórdenes observados afectan todos los órganos de la planta, aunque no todos tienen el mismo peso sobre el comportamiento *ex vitro*.

2.3.1. El tallo y las raíces.

Los tallos desarrollados *in vitro* tienen bajos contenidos de lignina, las paredes celulares son finas y tienen grandes espacios intercelulares y limitado desarrollo de los tejidos vasculares (Ziv, 1995).

Las plántulas en condiciones *in vitro* muestran carencia de tejido vascular funcional, con pobre conexión entre el tallo y el sistema radical. Los cuales con frecuencia restringen la absorción de agua (Grout y Aston, 1977; Grout y Millan 1985).

Las raíces *in vitro* contienen numerosos granos de almidón, abundantes espacios intercelulares y son generalmente hipertróficas con una longitud muy grande y tejido vascular primario. Mientras que las raíces *ex vitro* presentan células más uniformes y compactas, con tejidos vasculares primarios y secundarios (McClelland *et al.*, 1990).

Las raíces pueden ser inducidas bajo condiciones *in vitro* o *ex vitro* por las auxinas, pero las producidas *ex vitro* están mejor adaptadas para sobrevivir la etapa de aclimatización. Las que se forman en los medios con agar son, por lo general, adventicias y con conexiones vasculares pobremente desarrolladas. Por ello su contribución inmediata a la supervivencia de las plantas es dudosa, y depende de la especie (Preece y Sutter, 1991).

2.3.2. Cutícula, estomas y mesófilo de la hoja.

Por la gran humedad del ambiente en los frascos de cultivo, las plántulas no necesitan restringir el intercambio de gases. Como una consecuencia, se retarda el desarrollo de la cutícula y de las ceras epicuticulares (Brainerd y Fuchigami, 1981; Sutter, 1985; Debergh y Zimmerman, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1997; Majada *et al.*, 2000; Majada *et al.*, 2001).

Se ha observado que los estomas son generalmente redondos en lugar de elípticos, levantados con respecto a la epidermis y con paredes más finas. Lo que explica su incapacidad para cerrarse bajo condiciones que normalmente lo provocarían (Preece y Sutter, 1991). Los estomas de hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) con rasgos de hiperhidricidad, no cierran incluso cuando el potencial osmótico de las células oclusivas se incrementa en respuesta al ácido abscísico (ABA) o cuando son plasmolizadas en solución de sacarosa. Así, para estas hojas el ABA funciona como una señal de cerrado, pero otros

factores, quizás relacionados con las paredes celulares evitan el cierre del poro estomático (Pospíšilová *et al.*, 1997).

Por otra parte, estudios histoquímicos de las células oclusivas de clavel revelaron la presencia de menores niveles de cutina, pectinas y celulosa en la pared celular, (Ziv *et al.*, 1987). Además, encontraron que el fallo de las paredes celulares para contraerse en soluciones hipertónicas se correlaciona con la orientación anormal de las microfibrillas de celulosa. También se observó que aunque el potencial osmótico de las células oclusivas incrementó en respuesta al ABA, indicando que el protoplasto de los estomas no funcionales respondía a la señal de cerrado, el mismo no cerró; de modo que la hipolignificación, desorientación de las microfibrillas y la deposición de calosa en lugar de celulosa podrían haber contribuido a la hiperhidratación y al fallo estomático (Ziv, 1992 a).

En un estudio más reciente se encontró diferencias en la morfología de los estomas en diferentes especies *in vitro*, como respuesta a un tratamiento de ventilación. Mientras en los estomas de plántulas de uva (*Vitis vinífera* L.) y café (*Coffea* sp.) se observó una forma elíptica, típica de plantas cultivadas en campo, los de banano (*Musa* sp.) eran redondos (Ross-Karstens *et al.*, 1998). Este hecho se atribuyó al estado de desarrollo seleccionado para realizar las evaluaciones.

Con el empleo de tratamientos de ventilación en los frascos de cultivo, se observó modificaciones en las características anatómicas de los brotes y hojas de clavel; el engrosamiento de la cutícula, el incremento en el tamaño de las células, la reducción de los espacios intercelulares y el aumento en el grosor de la pared celular (Majada *et al.* 2000).

La luz tiene un marcado efecto en el desarrollo del mesófilo, mayormente en el desarrollo del parénquima de empalizada, un factor anatómico determinante en el crecimiento del vegetal. A medida que se incrementó la intensidad de la luz se apreció un mejor desarrollo del parénquima de empalizada (Weztein y Sommer, 1983)

En la mayoría de las especies estudiadas en condiciones *in vitro*, se ha encontrado que el mesófilo de las hojas posee un tejido de empalizada

pobrementemente desarrollado, generalmente formado por una sola capa de células, y fundamentalmente compuesto por tejido esponjoso con grandes espacios intercelulares (Brainerd y Fuchigami, 1981; Debergh y Zimmerman, 1991; Kozai *et al.*, 1992).

En resumen existen distintas respuestas de las plántulas a las diferentes condiciones *in vitro* en que se desarrollan, éstas tienen un efecto directo en el adecuado desarrollo de las estructuras y el funcionamiento de los órganos y organelos celulares como se describirá a continuación.

2.3.3. El potencial hídrico, la conductancia estomática y la tasa de transpiración.

El potencial hídrico de las hojas o brotes *in vitro* corresponde al potencial hídrico del medio, pues la transpiración es muy baja debido a la alta humedad relativa y la baja intensidad lumínica en los frascos de cultivo. El potencial hídrico decrece cuando aumenta la sacarosa en el medio; como la diferencia entre el potencial hídrico del medio y la planta es pequeña, el transporte de agua y quizás también de nutrientes es muy bajo (Desjardins *et al.*, 1988).

La tasa de transpiración y la conductancia estomática son superiores en plántulas *in vitro* cultivadas sin sacarosa a las cultivadas con 2% de ésta. También son mayores en aquellas que son cultivadas a mayor concentración de CO₂ en comparación con las tratadas a más bajas tensiones de CO₂ (Pospíšilová *et al.*, 1997).

Kozai *et al.* (1986) caracterizaron un pobre intercambio gaseoso en los frascos de cultivo *in vitro*. Este intercambio fue de 0,1 cambios de aire por hora para frascos con cubierta de aluminio, mientras que éste fue menor para frascos con tapas plásticas y mucho mayor para frascos con cubierta de membranas de polipropileno (4,4 a 6,2). El bajo intercambio gaseoso se asocia con el decrecimiento gradual del CO₂ en los frascos de cultivo durante las primeras horas del fotoperíodo como resultado de la fijación del CO₂ por el tejido clorofílico.

2.4. Hiperhidricidad.

La principal anomalía de la estructura y función de las plantas que son cultivadas *in vitro* con el empleo de medio líquido es la hiperhidricidad (Debergh *et al.*, 1992; Ziv, 1995), la que causa desórdenes morfológicos, que incluyen una estructura cristalina y acuosa del tejido, además de un crecimiento distorsionado. La hiperhidratación afecta la fotosíntesis, la transpiración y el intercambio de CO₂ y O₂, procesos de gran importancia para la calidad y supervivencia de las plántulas (Debergh y Zimmerman, 1991; Ziv y Ariel, 1994).

La manifestación de este desorden en las hojas se ha atribuido a la deficiente lignificación, síntesis reducida de celulosa, cambios en la flexibilidad de la pared celular y alteraciones en las relaciones hídricas de la célula (Ziv, 1991; Ziv y Ariel, 1994). Esto puede conducir a reducida presión de turgor, cambios en el potencial hídrico, incremento en la adsorción de agua y como resultado, la hipolignificación del tejido (Gaspar *et al.*, 1987).

2.5. Fotosíntesis.

En forma general se considera que las plantas cultivadas *in vitro* realizan escasa fotosíntesis, no obstante se ha confirmado la capacidad fotosintética de varias especies (Pospíšilová *et al.*, 1997; Van Huylenbroeck *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2001).

La pobre capacidad fotosintética de los brotes en condiciones *in vitro* es uno de los principales factores que limita la eficiencia de la micropropagación, en esto influye, el tipo y desarrollo fisiológico de los explantes, las condiciones ambientales, tales como, la concentración de CO₂ y O₂, la calidad de la luz y la presencia de azúcares exógenos (Desjardins, 1995 a).

Se ha planteado que la presencia de sacarosa en condiciones *in vitro* como fuente carbonada exógena es un factor que reduce la fotosíntesis (Desjardins, 1995 b; Hdider y Desjardins, 1995). Por otro lado, se reconoce que la fotosíntesis de las plántulas no se restringe por el pobre desarrollo del aparato fotosintético; sino principalmente, por la baja concentración de CO₂ durante la incidencia de la luz en los frascos de cultivo cerrados (Kozai *et al.*, 1995 b).

Al inicio del fotoperíodo la concentración de CO₂ es más o menos alta, luego comienza a bajar y después de una a cuatro horas alcanza el valor del punto

de compensación y luego se mantiene alrededor de ese valor. De modo que las plantas carecen de CO₂ más de la mitad del período de luz y por ello la fotosíntesis neta es baja, lo que retarda el crecimiento autotrófico (Pospíšilová *et al.*, 1997). Sin embargo, se han encontrado siempre niveles de CO₂ superiores a 350 mg L⁻¹ en el interior de los frascos de cultivo (Debergh *et al.*, 1992).

También se plantea la posibilidad de que las plantas alcancen un balance positivo de CO₂ *in vitro* y esto depende principalmente de la composición del ambiente gaseoso. Asimismo, se observó que las distintas cubiertas que se emplean para tapar los frascos se han diseñado para evitar la entrada de contaminantes y consecuentemente, restringen el intercambio de gases entre el interior y el exterior de los frascos de cultivo (Desjardins, 1995 a,b).

En investigaciones precedentes se han observado considerables incrementos en el crecimiento de las plántulas cultivadas en ambientes enriquecidos con CO₂ (Van Huylenbroeck y Debergh, 1992; Deng *et al.*, 1993; Desjardins, 1995 b; Kirdmanee *et al.*, 1995 a; Heo *et al.*, 1996; Seko y Kozai, 1996) y parte de este beneficio se debe al alargamiento del período en que las plantas pueden asimilar CO₂ atmosférico. La alta concentración de CO₂ también puede reducir la actividad de la Rubisco por ser una enzima alostérica, ello hace que también disminuya la fotorrespiración (Desjardins *et al.*, 1995 a). Sin embargo, se plantea que elevados niveles de CO₂ induce cambios bioquímicos y estructurales en hojas de *Sorghum* (Walting *et al.*, 2000).

En plántulas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) crecidas durante seis semanas bajo condiciones normales *in vitro* y otras con suministros adicionales de CO₂, se observó que las últimas mostraron altos contenidos de clorofilas a y b, carotenos, bajos contenidos de xantofilas y elevada actividad fotoquímica en el fotosistema II. Lo que conllevó al aumento también de la fotosíntesis neta (47,2 µg m⁻²s⁻¹), bajos rangos de transpiración y conductancia estomática de las hojas, esto indica que el CO₂ es un factor que estimula el crecimiento bajo estas condiciones de cultivo (Haise *et al.*, 1999).

Una sustancial fluorescencia de larga duración que es típica cuando se realiza la separación de la clorofila de los centros de reacción se observó por Lees *et*

al. (1991) en hojas de *Clematis*. Por ello, estos autores sugieren que esta desorganización de los pigmentos asimiladores de energía, puede ser responsable de la baja capacidad fotosintética de las hojas desarrolladas *in vitro*. Otras posibles causas de la baja fotosíntesis encontrada frecuentemente *in vitro*, son las anomalías en la estructura y la infuncionalidad de los estomas y en la ultraestructura del cloroplasto.

2.5.1. Estructura del cloroplasto y contenido de clorofila.

En algunas especies como la rosa (*Rosa multiflora* L.), la ultraestructura de los cloroplastos se corresponde con el de las plantas cultivadas *ex vitro*. En contraste, en plántulas de ciruela el estroma está atravesado por una red de membranas del tilacoide desorganizadas; mientras los cloroplastos de *Liquidambar styraciflua* son achatados y están desprovistos de almidón (Lee *et al.*, 1985; Pospíšilová *et al.*, 1997).

Es un efecto muy común observar en el desarrollo de la hoja en condiciones de bajos niveles de irradianza, que la planta invierte mayor cantidad de asimilatos en el complejo clorofila-proteína del aparato fotosintético, con vista a captar mayor luz (Levitt, 1980). Se ha demostrado que relativo a la superficie foliar, el contenido de clorofila en plántulas de *Liquidambar* es mayor a bajas que a altas intensidades de luz (Lee *et al.*, 1985).

Con relación al contenido de clorofila se reconoce que la misma es variable y que depende de la intensidad lumínica a que están sometidas las plántulas (Syvertsen y Smith, 1984; Grout y Donkin, 1987; Pospíšilová *et al.*, 1997).

Durante el desarrollo de la hoja, las células adquieren la capacidad de realizar fotosíntesis progresivamente, por la diferenciación de los plastidios dentro de los cloroplastos funcionales. Al mismo tiempo, el importante proceso de síntesis y degradación de la sacarosa se debe llevar a cabo según el grado de desarrollo alcanzado (Nguyen-Quoc *et al.*, 1990).

En general, las plántulas *in vitro* presentan un contenido total de clorofilas comparable al de las plantas cultivadas *ex vitro* bajo similares intensidades de luz (Donnelly *et al.*, 1995). No obstante, la poca funcionalidad de las clorofilas *in vitro* hace que sólo un número reducido de ellas ejerzan su función biológica cuando se trasladan a otros ambientes.

Como se ha podido constatar, las múltiples deficiencias o el bajo desarrollo alcanzado por los distintos órganos *in vitro*, las hace muy susceptibles a los estrés a que se someten cuando se trasladan a condiciones *ex vitro*. Es por ello que se imponen dos estrategias: la aclimatización *ex vitro* y la también llamada aclimatización *in vitro*. La primera se lleva a cabo en la fase final de la micropropagación, la segunda es objeto de estudio en los años más recientes.

2.6. Manejo de las condiciones ecofisiológicas *in vitro* y su efecto en el desarrollo de las plántulas.

Kozai *et al.* (1991) resumen los tres aspectos fundamentales de la respuesta de las plántulas micropropagadas luego de que se transfieren a la aclimatización.

1. La baja actividad fotosintética en las primeras semanas (producido por la fotoautotrofia incompleta, tasas de crecimiento negativas).
2. La excesiva transpiración (producida por las anomalías de sus órganos foliares y la dificultad en la absorción de agua y nutrientes por la insuficiencia en el desarrollo de las raíces).
3. El retardo del crecimiento o muerte de las plantas debido a lo antes mencionado.

Los aspectos antes descritos afectan la posibilidad en alcanzar porcentajes de supervivencia adecuados en la aclimatización, es por ello que se trabaja en preparar las plántulas desde las condiciones *in vitro* para obtener mejores resultados posterior a la salida de los frascos, lo que se ha llamado en los últimos años “aclimatización *in vitro*” (Ziv, 1995). Este término se refiere a la necesidad de una gradual reducción de la humedad relativa, incrementos de las concentraciones de CO₂ y de los niveles de intensidad lumínica y la reducción de los contenidos de fuente carbonada exógena en el medio de cultivo (Ziv, 1995, Kozai y Zobayed, 2000).

Bajo condiciones *in vitro* se alcanzaron incrementos en las variables de crecimiento evaluadas en plántulas de frambuesa roja (Deng *et al.*, 1993; Yue *et al.*, 1993). También, estos autores observaron una disminución de la transpiración con el empleo de la ventilación forzada en condiciones *in vitro*, lo

que sugiere que existió una respuesta de la funcionalidad de los estomas bajo estas condiciones.

Para reducir la humedad relativa en las condiciones *in vitro* se emplearon distintas variantes, una de ellas consistió en colocar los frascos sobre una lámina fría, lo que provocó que el vapor de agua se condensara y que disminuyera la humedad relativa en el interior de los vasos de cultivo. Lo cual permite una mayor preparación de las plántulas para su traslado a las condiciones de aclimatización (Vandereschaege y Debergh, 1987).

De forma general, disminuir el azúcar del medio de cultivo junto a un aumento de la concentración de CO₂, mejora la actividad fotosintética (Jeong *et al.*, 1995). Sin embargo, se debe considerar la etapa de cultivo y la especie en cuestión, ya que es difícil asumir que una pequeña yema, sin primordio radical y limitada área foliar, pueda desarrollarse sin una fuente de carbono exógena durante la etapa de multiplicación (Ziv, 1995).

Por otro lado, se observó un efecto positivo de la reducción de la sacarosa y el incremento de la concentración de CO₂ e intensidad lumínica en la estimulación del crecimiento y la actividad fotosintética en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) crecidas en condiciones *in vitro* (Cournac *et al.*, 1991), de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Paul y Stitt, 1993; Tichá *et al.*, 1998) y de remolacha (*Beta vulgaris*) (Kotvun y Daie, 1995).

Es conocido que la sacarosa es la fuente fundamental de suministro de carbono empleada por la planta en condiciones heterotróficas o mixotróficas. No obstante, el efecto que ejerce la misma sobre el metabolismo es aún contradictorio.

En rosa (*Rosa multiflora*) se ha observado que la presencia de altas concentraciones de sacarosa (5%) como fuente carbonada en el medio de cultivo en la etapa de endurecimiento mejoró la función de la hoja (Capellades *et al.*, 1991). El carbono asimilado en condiciones *in vitro* se almacena en las hojas que actuaron después como órganos de reserva durante los primeros días en aclimatización. Desjardins *et al.* (1987) lograron resultados similares evaluando estos tratamientos en fresa (*Fragaria vesca* L.) bajo condiciones *in vitro* y su posterior efecto en la aclimatización.

Se han observado mejores valores en las variables del crecimiento y la actividad fotosintética de *Cimbidium* en un medio sin sacarosa, con la adición de aire enriquecido con CO₂ (1 000 μmol mol⁻¹) e incrementos de los flujos de fotones fotosintéticos (100 μmol m⁻²s⁻¹) en condiciones *in vitro* (Heo *et al.*, 1996). Lo que indica el cambio del heterotrofismo al autotrofismo bajo estas condiciones de cultivo. También Kozai *et al.* (1995 a) mejoraron el crecimiento de boniato (*Ipomoea batatas* L.) con la creación de condiciones autotróficas *in vitro*.

Por otra parte, la supervivencia de las plantas se elevó en condiciones *ex vitro* cuando se le adicionó al medio de cultivo de cultivo *in vitro* inhibidores del crecimiento, como son el paclobutrazol y el ancymidol. El empleo sobre todo del paclobutrazol incrementó el contenido de cloroplastos y mejoró la resistencia al estrés (Ziv 1992 a,b).

Como se ha planteado anteriormente, el manejo de las condiciones ambientales bajo las condiciones *in vitro* estimula el crecimiento y la actividad fotosintética de las plántulas. Sobre todo el empleo de una fuente carbonada exógena ha sido una de las cuestiones más polémicas, por ello conocer el metabolismo de la misma en forma general y las enzimas involucradas en el proceso es de vital importancia (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995; 1998).

La sacarosa sintasa (SS) y las invertasas participan activamente en el transporte del azúcar entre el citosol, la vacuola y el apoplasto. De aquí la importancia que en los últimos años se le ha dado a evaluar el comportamiento de las mismas durante el proceso de multiplicación y aclimatización para un mejor conocimiento del metabolismo de la sacarosa (Nguyen-Quoc *et al.*, 1990).

Nguyen-Quoc y Fores (2001) proponen que los mecanismos de reacción son una degradación continua y rápida de la sacarosa en el citosol por la sacarosa sintasa, la resíntesis de la sacarosa a través de la propia sacarosa sintasa o de la sacarosa fosfato sintasa (SPS), la hidrólisis de la sacarosa en la vacuola por la SS o apoplasto por las invertasas ácidas y posteriormente un transporte de las hexosas al citosol donde son nuevamente convertidas en sacarosa, y rápidas síntesis y degradación del almidón en el amiloplasto. Ambos tipos de

enzimas (encargadas de síntesis e hidrólisis) están reguladas por muchos factores y se expresan durante el crecimiento de la planta.

El comportamiento de las enzimas involucradas en la síntesis de sacarosa y almidón no se han estudiado en hojas de caña de azúcar con la profundidad con que se han realizado en el tallo (Grof y Campbell, 2001). Sin embargo, en plantas de maíz (*Zea mays* L.), sí se han realizado estos estudios (Nguyen-Quoc *et al.*, 1990). Estos tipos de enzimas de síntesis de sacarosa y almidón se han localizado en las células de la vaina de la hoja (Echeverría y Boyer, 1986; Spilatro y Preiss, 1987), mientras que el sitio de la síntesis del disacárido se limita exclusivamente a las células del mesófilo (Lunn y Furbank, 1997).

En estratos de hojas jóvenes de maíz, la actividad de la sacarosa sintasa y las invertasas tienen la mayor importancia en la degradación de la sacarosa. Las actividades de ambas enzimas disminuyen durante el desarrollo y expansión de la hoja (Nguyen-Quoc *et al.*, 1990).

Se ha planteado que el suministro exógeno de sacarosa no favorece la fijación del carbono fotosintético por la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) y por ello los bajos niveles de fotosíntesis que se registran en plántulas *in vitro* (Hider y Desjardins, 1994). Sin embargo, en papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas en condiciones *in vitro* se comprobó que la sacarosa en el medio de cultivo al 5% combinada con aumento de la fuente nitrogenada, elevó significativamente la actividad de la PEPC y la Piruvato Kinasa, cuando se comparan con las plantas control (3%) y sin sacarosa (Dary *et al.* 2001; Dary y Desjardins, 2001). Es conocido que la PEPC es una enzima citosólica que tiene el importante papel de la fijación primaria del CO₂ en plantas C₄ y del metabolismo ácido de las plantas Crasuláceas (Osmund y Holtum, 1981; Borland, 1996).

Existen dos vías para alcanzar altos porcentajes de supervivencia de las plántulas en la aclimatización y con ello proporcionar mayor rentabilidad a las metodologías de micropropagación. La primera es controlar el ambiente en las etapas de elongación y enraizamiento *in vitro*, simulando las condiciones como se realiza durante la aclimatización *ex vitro*, de forma tal que las plántulas logren mayor desarrollo en sus órganos y soporten con mayor facilidad el drástico cambio de ambiente. La segunda es controlar el ambiente (luz,

humedad y temperatura) durante la aclimatización con gran precisión, por ejemplo empleando un sistema computarizado (Kozai y Zobayed, 2000).

2.7. Aclimatización *ex vitro*.

Sin menospreciar la importancia de los procedimientos de aclimatización *in vitro* y el valor incalculable que éstos pueden tener para lograr plantas de mayor calidad y disminuir los costos, hay que decir que la aclimatización *ex vitro* sigue siendo una etapa necesaria en cualquier protocolo de micropropagación.

La desecación de las plántulas, debido a la pérdida de agua foliar y restringida toma de la misma por la incapacidad de las raíces en los primeros momentos, es la principal causa de la muerte de las mismas en condiciones *ex vitro* (Preece y Sutter, 1991). Durante el proceso de aclimatización la humedad relativa, la luz y la temperatura son los factores ambientales que más afectan la supervivencia y la fotosíntesis neta de las plántulas (Kirdmanee *et al.*, 1994).

Con el objetivo de incrementar los porcentajes de supervivencia de las plántulas durante las primeras etapas de la aclimatización, el ambiente se debe controlar de forma que se simulen las condiciones bajo las cuales se cultivaron las mismas en las etapas de crecimiento y enraizamiento *in vitro*. Para así elevar las tasas de crecimiento y/o evitar el daño o muerte en la aclimatización (Kozai, *et al.*, 1991). Posteriormente, durante el tiempo de permanencia de las plántulas en la aclimatización, se deben incrementar los niveles de luminosidad y reducir la humedad relativa para simular las condiciones ambientales bajo las que se cultivarán las plantas en el campo. Además, el crecimiento y el incremento de la actividad fotosintética se deben promover paulatinamente durante todo el proceso de aclimatización (Kozai, 1991).

En la última década se han realizado trabajos que muestran resultados satisfactorios a partir del aumento de los niveles de luminosidad y CO₂ en condiciones *ex vitro*. Kadlecek *et al.* (2001) encontraron dos o tres veces mayor incremento en la masa seca, área foliar y actividad fotosintética en las plántulas crecidas bajo condiciones de 1 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ y 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz en condiciones *ex vitro*, lo que indica el efecto positivo que tienen el incremento

de las concentraciones de CO₂ y la intensidad lumínica sobre las variables del crecimiento en la fase de aclimatización.

Cuando se crecieron plantas de trigo (*Triticum aestivum*) bajo diferentes concentraciones de CO₂ (150, 300 y 800 μmol mol⁻¹) en condiciones *ex vitro* y luego de 18 días de expuestas a éstas, se transplantaron a 350 μmol mol⁻¹ CO₂. Se observó mayores incrementos en la masa seca de las hojas, raíz y tallo, además de un aumento en el área foliar, en las plántulas crecidas a mayores concentraciones de CO₂ (Ulman *et al.*, 2000, lo que indica el efecto positivo del suministro adicional de CO₂ en la fase de aclimatización.

En *Spathiphyllum* y *Calathea*, se evaluaron el comportamiento de algunas variables fisiológicas, así como los cambios efectuados por enzimas vinculadas al metabolismo de los carbohidratos y el sistema oxidativo durante el tránsito por la fase de aclimatización. Los resultados demuestran que existe un marcado efecto de la alta intensidad lumínica (360 μmol m⁻²s⁻¹) sobre la actividad fotosintética de las plántulas, cuando se compararon con intensidades de 120 μmol m⁻²s⁻¹, aunque en la intensidad mayor se observó fotoinhibición transitoria en los primeros momentos de la aclimatización Van Huylenbroeck *et al.* (1998, 2000).

Cuando se evaluó efecto de los incrementos en la intensidad lumínica y el CO₂ en las enzimas del sistema oxidativo de las plántulas de uvas (*Vitis viniferas* L.) y castaño (*Catanea* sp.) durante la etapa de aclimatización. Carvalho y Amancio (2002) observaron un significativo efecto de la alta intensidad lumínica (360 μmol m⁻²s⁻¹) sobre la biomasa (dos veces mayor), mientras que en la actividad fotosintética se encontró que las hojas formadas *in vitro* no mostraban diferencias significativas con los niveles de menor luminosidad ensayados (120 μmol m⁻²s⁻¹), lo que indica que estas condiciones de crecimiento estimularon el cambio al autotrofismo de las plántulas.

Al realizarse un estudio de la intensidad lumínica en condiciones *in vitro* y sus efectos durante la aclimatización, Amancio *et al.* (1999) encontraron diferencias significativas en los contenidos de clorofilas a y b entre las plantas crecidas a bajos y altos flujo de fotones fotosintéticos, aunque estas diferencias no se observaron entre las hojas emitidas *in vitro* y las hojas jóvenes desarrolladas en

condiciones *ex vitro*. En la actividad fotosintética, así como los contenidos de sacarosa y almidón también se observó esta diferencia, los mismos fueron mayores en las plantas sometidas a altas intensidades de FFF. También se demostró el efecto directo que ejercen las altas intensidades sobre las hexosas, las mismas se incrementaron un 180% después del traslado de las plantas de condiciones *in vitro* a las condiciones de baja luminosidad, mientras que en el tratamiento de altos niveles de luminosidad éstas se incrementaron 290%.

Al comparar el desarrollo durante la fase de aclimatización de plantas de *Rehmannia glutinosa* crecidas *in vitro* bajo condiciones heterotróficas y autotróficas (Jeong-Hoo *et al.*, 2000) observaron una disminución de los niveles de clorofilas en los primeros 15 días, posterior a esta fecha comenzaron a aumentar los mismos en las plántulas provenientes de condiciones heterotróficas. En las plántulas bajo condiciones autotróficas los contenidos de carbohidratos se incrementaron posteriores a los 12 días de permanecer en aclimatización, mientras que las mismas en condiciones heterotróficas mantuvieron concentraciones estables de los sacáridos.

En la micropropagación convencional el proceso de aclimatización frecuentemente se resume solamente a los siguientes aspectos: colocar las plantas en condiciones de alta humedad relativa, una gradual disminución de la misma y un incremento paulatino de la intensidad de luz a través del tiempo (Preece y Sutter, 1991; Donnelly *et al.*, 1995). Sin embargo, en esta etapa también son importantes otros factores como el tipo de sustrato y el control fitosanitario.

2.7.1. Principales componentes empleados en la elaboración de sustratos.

Son variados los materiales que se emplean para preparar sustratos. Estos se pueden usar solos, pero con frecuencia con las combinaciones de dos o más materiales se alcanzan mejores resultados. Hartmann *et al.* (1997) mencionan las propiedades que deben caracterizar los sustratos:

- ◆ El medio debe ser suficientemente firme y denso para sostener las plántulas.

- ◆ Debe retener suficiente humedad (40-50%) de modo que no sea necesario regar con mucha frecuencia.
- ◆ Debe ser suficientemente poroso para facilitar el drenaje, permitiendo la adecuada penetración de oxígeno a las raíces (10-20% de O₂).
- ◆ Debe estar libre de contaminantes (semillas, nemátodos y patógenos).
- ◆ No debe tener un alto nivel de salinidad. La conductividad eléctrica debe ser menor de 1,75 mohm cm⁻¹.
- ◆ Debe ser capaz de pasteurizarse por calor o con productos químicos sin que sufra daños.
- ◆ Debe proveer adecuada nutrición en situaciones en que las plantas deben permanecer por largos períodos, aunque generalmente se recomienda el empleo de fertilizantes de lenta liberación. La capacidad de intercambio de nutrientes de 79-190 meq 100 g⁻¹.
- ◆ Mantener el pH entre 5,5-6,5.

Además deben ser fácilmente reproducibles y disponibles. Con estas características las mezclas de sustratos logran incrementar los niveles de supervivencia y el ritmo de crecimiento del cultivo (Ball, 1998).

Algunos de los sustratos o componentes de mezclas de sustratos más empleados en Cuba son:

Turba: formada por restos de vegetación de pantano o ciénaga que se han preservado bajo el agua en un estado parcialmente descompuesto. La carencia de oxígeno en la ciénaga limita la descomposición bacteriana y química del material vegetal. La composición de los diferentes depósitos de turba varía en dependencia de la vegetación a partir de la cual se origina, el estado de descomposición, el contenido de minerales y la acidez inciden directamente en los resultados que se desean alcanzar (Whittle, 1987).

Arena: consiste generalmente en pequeñas partículas de cuarzo (0,05-2,00 mm de diámetro), cuya composición mineral depende del tipo de roca. Es el más pesado de todos los sustratos usados para enraizar estacas o el cultivo de plantas en vivero. Esta debe ser fumigada o pasteurizada en estufa antes de usarla, pues puede contener semillas y varios patógenos. La arena no contiene nutrientes y no tiene capacidad de cambio catiónico, por ello es empleada

fundamentalmente en combinación con materiales orgánicos (Hartmann *et al.*, 1997).

Zeolitas: son aluminosilicatos hidratados generalmente de sodio. Su estructura es cristalina, permite la entrada de iones potasio (K^+) y amonio (NH_4^+) que actúan como fertilizantes de lenta liberación. Las mezclas con turba pueden alcanzar una capacidad de cambio catiónico de 250-300 meq L^{-1} . Esta mezcla es capaz de retener agua utilizable por las plantas (Agramonte *et al.*, 1998).

Cachaza: es un residuo del proceso de clarificación del jugo de la caña de azúcar, que consiste en una mezcla de fibras, sacarosa, tierra, cera, compuestos albuminoides y algunos elementos como fósforo, nitrógeno y calcio. Su contenido de potasio es bajo (Urquiza *et al.*, 1980).

En la aclimatización de plántulas de caña de azúcar se han empleado diferentes sustratos constituidos por zeolita y su combinación con cachaza en distintas proporciones; los resultados han demostrado que con el empleo de la zeolita sola o combinada con cachaza como sustratos, se alcanzan mayores porcentajes de supervivencia; los peores se registraron con la utilización de suelo combinado con cachaza y otros compuestos con altos contenidos de materia orgánica (Terán *et al.*, 1996; Ortíz *et al.*, 1998 a,b).

2.7.2. Manipulación de la luz en las casas de cultivo.

La luz es uno de los factores que influyen en la fase de aclimatización. El control de la intensidad lumínica es importante ya que las plantas provienen de un ambiente con baja intensidad y se transfieren a uno con alta intensidad, lo cual puede causar quemaduras severas del follaje, fotoinhibición y fotodegradación de las clorofilas (Van Huylenbroeck, 1994; Van Huylenbroeck *et al.*, 1995).

Para atenuar el efecto de la luz se emplean mallas plásticas de diferentes porcentajes de sombreo durante las primeras semanas. Posteriormente éstas se retiran gradualmente, hasta que las plantas son expuestas al mayor nivel de luz posible, lo cual facilita su posterior adaptación a condiciones de campo. En algunas instalaciones estas mallas son fijas, pero en otras son móviles, que es la variante más conveniente por la flexibilidad que requiere esta manipulación (Agramonte *et al.*, 1998).

Sorretino *et al.* (1997) analizaron el efecto de la luz y la temperatura del aire sobre la fotosíntesis en hojas de plántulas de Lilio expuestas a altas intensidades de estas variables. Esos autores observaron que estas dos variables no afectaron el normal crecimiento y desarrollo de las plantas a pesar de ser incrementadas notablemente.

2.7.3. Manejo de la humedad relativa.

Debido a que las plantas provenientes del cultivo *in vitro* no son capaces de regular su economía hídrica, por los desórdenes ya antes mencionados, éstas deben mantenerse en condiciones de alta humedad relativa en el período inicial de aclimatización (Van Huylbroeck y De Rieck, 1995). En etapas posteriores la humedad relativa debe disminuir gradualmente hasta alcanzar los niveles del ambiente externo.

Santana *et al.* (1996 b) alcanzaron altos porcentajes de supervivencia (superiores a 95%) en plántulas de cafeto (*Coffea arabica* L.) que provenían de embriones somáticos, con sólo trabajar con la cubierta de los umbráculos que le proporcionaban altos niveles de humedad en condiciones de viveros, mientras que en condiciones de invernadero sin cubierta sólo alcanzaron un 16%.

El control de la humedad relativa en las casas de cultivo se ejerce con el empleo de varios sistemas:

Sistemas cerrados: se trata de túneles de polietileno que logran una reducción de la pérdida de agua de las hojas, con el incremento de la humedad relativa resultante, aunque estos sistemas tienden a conservar el calor. El tejido de la hoja no se enfría debido a que hay un mínimo movimiento de aire y enfriamiento evaporativo. Para reducir el calor, se regula la intensidad de luz con sombra (Hartmann *et al.*, 1997). Al emplear este sistema, Etienne *et al.* (1997) alcanzaron altos porcentajes de supervivencia en plántulas de café con sólo tres frecuencias de riego diarias.

Nebulización intermitente: estos sistemas crean una lámina de agua sobre las plantas y el sustrato. De este modo, la pérdida de agua, tanto de la hoja como de su alrededor, se reduce por la reducción de la temperatura que se produce al evaporarse el agua y además por el aumento de la humedad relativa (Van

Huylenbroeck *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 1997). Estos sistemas son ampliamente empleados en la propagación por estacas de diferentes especies para garantizar que no se deshidraten las mismas y obtener altos porcentajes de supervivencia (Rodríguez *et al.*, 1998).

Sistemas de roseta: Son sistemas que provocan gran dispersión de las gotas de agua (50-100 μm), permitiendo que el agua quede suspendida por varios segundos como una nube. Estos sistemas elevan la humedad relativa y evitan el sobre-humedecimiento del sustrato (Hartmann *et al.*, 1997).

Sistemas de niebla: son generadores de niebla o atomizadores que producen gotas de aproximadamente 20 μm de diámetro. Estos sistemas elevan la humedad relativa entre 93-100%. Dentro de sus características está que el agua queda suspendida en el aire como vapor, mientras las gotas mayores pierden su suspensión y caen a la planta y al sustrato (Hartmann *et al.*, 1997). El empleo comercial de los mismos es reducido por los altos costos, no obstante, en *Poinsettia* se han logrado buenos resultados en el enraizamiento de estacas (Ball, 1998).

2.7.4. Control fitosanitario.

Las plantas provenientes del cultivo *in vitro* son más susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, cuyos agentes causales pueden estar presentes en el sustrato o en el ambiente de la instalación. Muchas de estas enfermedades están asociadas a una alta humedad del sustrato, por lo que el control estricto del régimen de riego es la primera medida a tener en cuenta en este caso, así como asegurar un correcto drenaje en los contenedores. Sobre el tema en cuestión se realizaron trabajos muy novedosos por Herrera *et al.* (1994) donde evaluaron plántulas de papa, banano, ajo y caña de azúcar en la fase de aclimatización y determinaron los factores de mayor influencia en la supervivencia y desarrollo de las plántulas.

La desinfección del sustrato, ya sea por vía química (formalina) o física (calor por solarización, estufa o autoclave), es una medida efectiva para disminuir las pérdidas provocadas por patógenos que se encuentran en el sustrato. La utilización de agentes biológicos con hongos antagonistas como *Trichoderma viride* también es una alternativa de control eficiente de la manifestación y

acción de otros microorganismos indeseables (Agramonte *et al.*, 1998; Companioni *et al.*, 1998). Este efecto secundario lo han ejercido tratamientos con micorrizas y *Azotobacter* en los sustratos empleados en la aclimatización de plántulas de piña (Expósito *et al.*, 1993; González *et al.*, 1995).

2.7.5. Empleo de Reguladores del crecimiento.

Los reguladores del crecimiento que estimulen un desarrollo favorable se pueden emplear en la aclimatización para lograr plantas con las características comerciales deseadas en un corto tiempo con el consiguiente aumento de la rentabilidad del proceso. Los reguladores del crecimiento vegetal no se deben utilizar indiscriminadamente ya que pueden influir negativamente y en algunos casos afectar el cultivo.

Los reguladores del crecimiento como agentes antitranspirantes se han empleado en diferentes cultivos, aunque no es una práctica muy común a escala comercial. Preece y Sutter (1991) con aplicaciones de ABA en condiciones *in vitro* lograron incrementos de la resistencia estomática y con ello mayores niveles de supervivencia de las plántulas en las condiciones de aclimatización. También Roberts *et al.* (1992) alcanzaron resultados similares en plantas de crisantemo y rosa con la aplicación de paclobutrazol al medio de cultivo *in vitro*.

Se estima que el proceso de enraizamiento *in vitro* en un protocolo de micropropagación es aproximadamente entre el 35-75% del costo total (Debergh y Zimmermam, 1991), por ello es importante realizar esta actividad en condiciones *ex vitro*. El empleo de auxinas (AIB, ANA, AIA) y sus diferentes combinaciones en esta etapa es de las más empleadas con este fin (Conover y Pool, 1984; Al-Juboory *et al.*, 1991, 1997).

También es una práctica común el empleo de reguladores para incrementar el crecimiento y desarrollo de las plántulas. De la Fé *et al.* (1998), en un estudio de la influencia de las aplicaciones foliares de un análogos de brasinoesteroides en caña de azúcar observaron un efecto positivo en la altura, lo que redujo notablemente el tiempo de permanencia de las mismas en la fase de aclimatización

Rodríguez *et al.* (1998) con aplicaciones foliares de GA₃ lograron estimular el crecimiento y desarrollo en plántulas y estacas de *Ixora coccinea*, reduciendo el tiempo de permanencia en 15 días en la fase de aclimatización. También, Acosta *et al.* (1995) alcanzaron resultados favorables cuando se empleó compuestos bioestimulante en la fase de adaptación en papa, banano y caña de azúcar.

Aunque la aclimatización es un tema frecuentemente tratado en la literatura especializada, la recopilación bibliográfica realizada demuestra que en caña de azúcar no se ha estudiado profundamente. La carencia de estudios básicos en esta especie (fisiológicos, histológicos y bioquímicos) ha provocado que muchas tecnologías de aclimatización no sean reproducibles en diferentes laboratorios comerciales, y que ninguna de ellas haya alcanzado las máximas tasas de supervivencia y crecimiento de las plantas.

3.0. MATERIALES Y MÉTODOS.

El conjunto de experimentos se realizaron en el Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Para el desarrollo de los mismos se emplearon como modelo plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) var. C91-301 propagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT) según protocolo establecido por Lorenzo (1998). El que se resume en: colocar cinco brotes axilares en el biorreactor de inmersión temporal (BIT) con capacidad de 1 L, el cual contiene 250 mL del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) en forma líquida suplementado con 1,33 μM Benzyladenine (BA) + 3,40 μM Paclobutrazol (PBZ) durante los primeros 30 días en la fase de multiplicación. Posterior a la fase de multiplicación se realiza un cambio del medio de cultivo MS, que incluye la sustitución de los reguladores antes descritos por Acido Giberélico (GA_3) a 2,88 μM durante los próximos 15 días, período que dura la fase de crecimiento y desarrollo.

Las condiciones de cultivo bajo las cuales se desarrollaron las plántulas fueron: 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF), frecuencia de inmersión de cada tres horas y con un tiempo de inmersión de cinco minutos, período en que las mismas permanecieron en contacto con el medio de cultivo líquido.

Las plántulas se transfirieron para las condiciones de aclimatización luego de ser sumergidas en una solución de Score 2% durante cinco minutos. Se empleó bandejas plásticas de 144 pocillos (52,5 cm de ancho x 29,5 cm de largo y 4,0 cm de alto) con una capacidad de 25 cm^3 cada uno.

3.1. Efecto de la calidad de las plántulas en el momento de salida de las condiciones *in vitro* a las *ex vitro*.

Las plántulas provenientes de biorreactores de inmersión temporal se agruparon según la masa fresca (g), el número de hojas y la longitud de las plántulas (cm), en las siguientes categorías (tabla 1):

Tabla 1. Categorías de las plántulas en el momento de salida de las condiciones *in vitro* a las *ex vitro*.

Categorías	Plantas/frasco	Masa fresca (g)	Nº hojas	Longitud (cm)
------------	----------------	-----------------	----------	---------------

Muy Pequeñas	17 (11%)	0,11 - 0,20	< 3,0	< 3,0
Pequeñas	35 (24%)	0,21 - 0,30	3,0 - 3,5	3,1 - 4,0
Medianas	62 (43%)	0,31 - 0,50	3,6 - 4,0	4,1 -10,0
Grandes	29 (20%)	> 0,51	> 4,0	> 10,0

Aunque se evaluaron tres variables fisiológicas, es de destacar que los experimentos se realizaron en base a los valores de la masa fresca de las plántulas, las otras variables son información adicional para el mejor empleo por los operarios en los laboratorios comerciales. La figura 2 muestra las características cualitativas de las distintas categorías establecidas según los criterios cuantitativos antes descritos.



Figura 2. Características de las diferentes categorías empleadas en el momento de salida de las condiciones *in vitro* (las escalas en cada figura se corresponden con unidades en cm).

Las plántulas de cada categoría se plantaron en un sustrato constituido por turba estéril, según indicaciones de su fabricante (Pro-mix[®] de premier, Canadá). Las mismas se colocaron en casas de aclimatización bajo condiciones controladas de luminosidad, con el empleo de mallas que permitían el paso de $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y bajo riego mediante nebulizadores (Miniaspersor 809) el cual produce un rocío de gotas minúsculas de 0,2 mm de diámetro y mantiene una humedad constante, con un sistema con control automatizado que garantizó humedad relativa del 90%.

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado, cada tratamiento contó con 120 plántulas (12 repeticiones con 10 plántulas cada

una). A los 28 días se evaluó el porcentaje de supervivencia, el que se realizó contando físicamente las plántulas que se mantenían vivas.

3.2. Efecto del tipo de sustrato en la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.

En este experimento se emplearon plántulas de la categoría mediana (0,31-0,50 g), se plantaron en distintos tipos de sustratos en bandejas plásticas como las descritas anteriormente. Los sustratos empleados fueron los ya establecidos en algunos laboratorios especializados en la propagación de caña de azúcar y las biofábricas del país (compost: constituido por la mezcla de ceniza de la incineración de hojas de caña de azúcar, humus de lombriz, estiércol vacuno y residuos vegetales), los que se compararon con la turba como sustrato universal. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en el experimento anterior ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 90% HR).

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con dos factores, cada tratamiento contó con 120 plántulas (12 repeticiones de 10 plántulas cada una). Se evaluó el porcentaje de supervivencia cada siete y hasta los 28 días.

Los tratamientos experimentales quedaron constituidos de la siguiente forma:

Factor I	Factor II
1- Turba.	1- Salida <i>in vitro</i> (0)
2- Turba + Zeolita (1:1, v:v)	2- 7 días
3- Compost	3- 14 días
4- Cachaza + Ceniza de caña de azúcar (1:1, v:v)	4- 21 días
	5- 28 días

En el caso de la mezcla de cachaza + ceniza y compost, se tamizaron previamente para uniformar sus partículas a un grosor de 1 mm. Posterior a ello, estos se desinfectaron en estufa a 100°C durante cuatro horas.

La composición química de los sustratos empleados en cuanto al contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, materia orgánica (MO), agua y pH se describe a continuación (Tabla 2):

Tabla 2. Composición química de los sustratos.

Sustrato	N	P	K	Ca	Mg	MO	H ₂ O	pH
----------	---	---	---	----	----	----	------------------	----

	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Turba.	2,64	0,44	0,21	2,16	0,57	31,50	45,72	4,95
Turba+Zeolita (1:1, v:v)	1,12	0,21	0,10	1,85	0,28	25,30	34,60	4,76
Compost	1,16	0,46	0,12	1,60	0,82	44,00	23,52	6,20
Cachaza+Ceniza (1:1,v:v)	1,60	1,68	0,58	4,92	0,85	28,00	30,81	6,30

Las determinaciones químicas se realizaron según el Manual de análisis químico para humus de lombriz, abonos y sustratos orgánicos, recomendado por el Instituto Nacional de Suelos (NRAG-1/94). Los análisis se realizaron en el Laboratorio Provincial de Suelos del Ministerio de la Agricultura (MINAGRI) en la provincia de Camagüey, para ello se tomaron 10 muestra de cada sustrato, las cuales fueron promediadas para obtener el dato final.

En la tabla 3 se pueden observar las características físicas de los sustratos, para ello se tomaron 5 muestra de cada sustrato y se promediaron los valores, las características fueron determinadas mediante los métodos que se describen a continuación:

- Densidad del sustrato (δ): Método de los cilindros (Vadiunina y Kochaguina, 1986).
- Densidad de la fase sólida (γ): Método del picnómetro.
- Porosidad total (P.T.): Cálculo $PT = (1\delta / \gamma) \times 100$
- Humedad higroscópica máxima (**Hy**): Método tensométrico con K_2SO_4 (Vadiunina y Kochaguina, 1986).
- Humedad de marchitez (**HM**): Calculado a partir de Hy, con el empleo de 1,35 como coeficiente.
- Coeficiente de permeabilidad (**K**): Según Skalabaú (1991) con el empleo del permeámetro de cargas constante.

Tabla 3. Composición física de los sustratos.

Sustrato	δ (g/cm ³)	γ (g/cm ³)	PT (% (vol.))	H γ (% mg s ⁻¹)	HM (% mg s ⁻¹)	K (mm h ⁻¹)
Turba.	0,11	1,17	90,39	26,72	36,09	576,0
Turba+Zeolita (1:1, v:v)	0,58	1,89	68,04	19,86	26,81	171,0
Compost	0,82	2,18	62,38	18,43	25,68	114,3

Cachaza+Ceniza (1:1, v:v)	0,56	2,24	94,01	17,78	23,83	72,0
---------------------------	------	------	-------	-------	-------	------

3.3. Efecto del flujo de fotones fotosintéticos sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.

Las plántulas que se clasificaron previamente como medianas (0,31-0,50 g) se plantaron en un sustrato compuesto por una mezcla de cachaza + ceniza (1:1, v:v) y en bandejas plásticas. Las mismas se colocaron en cámaras de aclimatización construidas para éste experimento, las que con el empleo de distintas mallas se lograron diferentes intensidades de FFF y bajo condiciones controladas de humedad 85% HR, la cual se garantizó con el empleo de un sistema automatizado de riego por nebulizadores (Miniaspersor 809) el cual produce un rocío de gotas minúsculas de 0,2 mm de diámetro y mantienen una humedad constante.

En cada cámara se realizaron 20 evaluaciones luxométricas con el empleo de un luxómetro FAITHFUL FT-710 y cuando el sol se encontraba en el cenit. Las mediciones se convirtieron en flujo de fotones fotosintéticamente activos ($FFF = \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) según los coeficientes establecidos por Anon (1984).

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con dos factores, cada tratamiento contó con 120 plántulas (12 repeticiones con 10 plántulas cada una). Se evaluó cada siete y durante 28 días el porcentaje de supervivencia en cada caso.

Los tratamientos quedaron constituidos de la siguiente forma:

Factor I	Factor II
1- 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	1- Salida <i>in vitro</i> (0)
2- 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	2- 7 días
3- 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	3- 14 días
4- 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.	4- 21 días.
	5- 28 días.

3.4. Efecto de la reducción de la humedad relativa y el incremento de los FFF sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.

Se emplearon plántulas provenientes de los biorreactores de inmersión temporal, las cuales se agruparon según la categoría descrita en el experimento anterior. Como sustrato se empleó una mezcla de cachaza +

ceniza (1:1, v:v). Las mismas se expusieron a diferentes condiciones ambientales, las que se explican en la tabla 4. Los cambios de ambiente se realizaron a los 28 días, fecha que se seleccionó bajo el criterio de ser el momento en que las plántulas alcanzan su mayor desarrollo bajo condiciones ambientales controladas.

Tabla 4. Condiciones ambientales a que se expusieron las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización.

	Desde 0 a 28 días	Desde 28 a 42 días
Tratamiento I	90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Tratamiento II	95% HR y 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Tratamiento III	95% HR y 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	80% HR y 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Tratamiento IV	90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	80% HR y 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Las condiciones de 90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se corresponden con las casas de cultivo, mientras 95% HR y 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se lograron con el empleo de túneles en el interior de esas instalaciones. Los ambientes caracterizados por 80% HR y 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se lograron en exteriores. Las variables climáticas en la etapa en que se desarrolló el experimento se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Principales variables climáticas que caracterizaron el ambiente exterior.

Decena	Temperatura (°C)		Precipitación (mm)	Humedad Relativa (%)
	Mínima	Máxima		
I	22.0	32.4	82.6	79
II	21.5	32.5	23.8	81
III	22.5	30.2	00.0	80
Media	22,0	31,7	35,5	80

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado, cada tratamiento contó con 80 plántulas (10 repeticiones con 8 plántulas cada una).

El análisis del porcentaje de supervivencia se realizó para cada tratamiento a los 42 días, al inicio y final del experimento se evaluó la masa fresca (g) y el

número de hojas fotosintéticamente activas (hojas completamente verdes). En la evaluación final se contó además el número de hijos que se emitieron.

3.5. Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado a ambiente natural.

En el experimento se evaluó el momento de traslado de un ambiente a otro, las plántulas clasificadas como medianas (0,31-0,50 g) se subdividieron en tres grupos constituidos por una bandeja de 80 plántulas por cada tratamiento experimental. En las cuales se empleó un diseño completamente aleatorizado, que contó con 10 repeticiones de 8 plántulas cada una. Las que se trasladaron a los 14, 21 y 28 días respectivamente de los ambientes controlados (90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a ambiente natural (80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). En las condiciones ambientales controladas se empleó un sistema automatizado de riego por nebulizadores, como el descrito en experimentos anteriores, que garantizó humedad relativa del 90% en el interior de las casas de cultivo.

El porcentaje de supervivencia se evaluó al final del experimento (42 días).

3.6. Evaluación de las características morfo-fisiológicas de las plántulas durante la aclimatización.

3.6.1. Evaluación de indicadores morfológicos de la calidad de las plántulas.

Se emplearon plántulas con las características descritas en el experimento anterior en un sustrato constituido por cachaza + ceniza (1:1, v:v). Las que se colocaron en condiciones de aclimatización con control de la humedad relativa y luminosidad (90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante los primeros 21 días, luego de esta fecha se trasladaron a condiciones de exteriores (80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), donde permanecieron otros 21 días.

Desde el momento de salida, cada siete y hasta los 42 días, se evaluaron en 10 plántulas los siguientes indicadores morfológicos de calidad: masa fresca de la planta (g), masa seca de la planta (g), número de hojas por planta, número de raíces por planta, densidad estomática en las hojas expandidas (estomas/ mm^2), superficie foliar de la planta (cm^2) y el contenido de clorofila a y b (nmol mL^{-1}). Todas las plántulas se muestrearon entre las 9:00 am y 10:00 am, se tomaron las plántulas de forma completamente aleatorizada donde se consideró a cada una como unidad experimental.

El análisis de la densidad estomática se realizó en un microscopio OPTON. Se tomaron hojas completamente expandidas, a las cuales se les aplicó esmalte traslúcido a la parte central del envés, pasados 15 minutos se retiró el esmalte y se evaluó el número de estomas según Ortega y Rodés (1990) donde la fórmula se expresó como la densidad estomática ($\text{estomas}/\text{mm}^2$) = N° estomas por campo /área del campo (mm^2). Se realizaron las observaciones en 10 plántulas seleccionadas al azar y se observaron 10 campos por cada una.

La superficie foliar se determinó mediante un método fotogravimétrico con el empleo de una fotocopidora según la técnica descrita por Sestak *et al.* (1971). El cual consiste en relacionar la masa de un papel con área conocida y con la masa y superficie foliar de la planta.

Para la determinación de la masa seca, las plántulas de forma individual se colocaron en sobres y se introdujeron en una estufa a 80°C, los datos se obtuvieron cuando los valores fueron constantes.

Para las determinaciones del contenido de clorofilas a y b, se utilizaron 100 g de hojas completamente expandidas en cada momento de evaluación. La extracción se realizó con acetona al 80% y se cuantificaron según el protocolo descrito por Porras (1991).

Para los estudios histológicos en horas de la mañana (9:00 am) se tomaron hojas completamente expandidas. Se emplearon 10 plántulas por cada momento de evaluación (momento de salida de las condiciones *in vitro*, 21 y 28 días en aclimatización), momentos que se consideran de mayor trascendencia dentro del proceso de aclimatización evaluado. Las que se tomaron de forma aleatorizada donde se consideró a cada plántula como una unidad experimental.

En los análisis histológicos las hojas se fijaron en una solución de etanol al 95%, agua destilada, formalina y ácido acético, en relación 10:7:2:1, respectivamente. Posteriormente se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol butílico terciario (50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%). Finalmente las muestras se colocaron en moldes para la infiltración con historesinas, la inclusión y formación de bloques.

Los cortes transversales se realizaron a cuatro micras de grosor, con el empleo de un micrótopo de rotación. Para la tinción de las muestras se empleó la técnica de Schiff-naphthol blue black (O'Brien y McCully, 1981). La interpretación y toma de fotografías se realizaron con un microscopio Nikon microphot-FX.

Se realizaron 10 observaciones por campo y se determinó del desarrollo del haz vascular en cada momento de evaluación.

3.6.2. Comportamiento de la sacarosa y las principales enzimas involucradas en el metabolismo del carbono durante el proceso de aclimatización.

- Determinación de las concentraciones de sacarosa.

Para la extracción de la sacarosa se tomaron 200 mg de masa fresca de hojas completamente expandidas, las cuales se maceraron en nitrógeno líquido hasta pulverización, luego se adicionó 1 mL de etanol al 70% (v/v) hasta homogenizar la solución. Esta se colocó en tubos con especial hermeticidad a 90°C durante 60 minutos, posteriormente se centrifugó a 10 000 g, del sobrenadante se tomó 1 mL y se concentró a 0°C en un concentrador Speed-vac. El concentrado se resuspendió en 100 µL H₂O destilada estéril.

La sacarosa se determinó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La fase preparativa de este proceso contó con la concentración del extracto a través de un Sep-Pak con un cartucho de C 18 y el filtraje a través de membrana de 0,45 µm. Finalmente se inyectó 20 µL a un HPLC de Pharmacia LKB con un detector de índice de refracción. Se utilizó una columna HPX-87H (BIORAD, 300 x 7,8 mm), como fase móvil se empleó el ácido sulfúrico a 0,005 mol L⁻¹ a una razón de flujo de 0,3 mL min⁻¹. Como patrón se utilizó la sacarosa (1% m/v) a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Los resultados se expresaron como mg de sacarosa por gramo de masa fresca (mg g⁻¹ mf).

Se utilizaron hojas de diferentes plántulas seleccionadas de forma aleatoria se realizaron tres extracciones y se determinó la concentración de sacarosa por triplicado, para un total de nueve datos.

- Determinación de la actividad enzimática.

Para el análisis de las enzimas, se emplearon 250 mg de masa frescas de hojas completamente expandidas, las cuales se homogenizaron en nitrógeno

líquido con la ayuda de un mortero. Las enzimas se extrajeron según el método descrito por Geigenberger y Stitt (1991).

La actividad de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) (EC 2.4.1.14) se determinó a pH 7.5 con 50 μL del extracto libre de sales. La mezcla se incubó por 20 minutos a 30°C y la reacción se detuvo con la adición de 70 μL de KOH (5,35 mol L^{-1}). Para el blanco la reacción se detuvo con la adición de 70 μL de KOH (5,35 mol L^{-1}) a los 0 minutos (Anguenot, 2003. http://www.agrobiotheque.ca/Protocoles/enzymo/_sucrosesynthase.html). La formación de sacarosa se determinó mediante el método de la antrona (Van Handel, 1968) y se expresó en $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{mf}$.

La actividad de las invertasas (EC 3.2.1.26) se determinó en una mezcla de reacción de 500 μL del volumen total que contiene enzimas libres de sales y 50 mmol L^{-1} de sacarosa. Para el caso de la invertasa neutras se utilizó un tampón (HEPES-KOH) a pH 7,5 y para las invertasas ácidas, un tampón de acetato de sodio a pH 4,5. La reacción se inició con la adición de la enzima, incubada previamente durante 20 minutos a 30°C . La formación de hexosa se determinó enzimáticamente según la técnica descrita por Miron y Schàffer (1991) la que se expresó en $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{mf}$.

La actividad de la sacarosa sintasa (SS) (EC 2.4.1.13) se determinó por el mismo procedimiento descrito para las invertasas, pero con la adición de 10 μL de uridin difosfato (UDP) a 10 mmol L^{-1} después que la reacción catalizada por la invertasa neutra llegara a su completa verificación, según el método de Anguenot (2003) la que se expresó en $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{mf}$.

Se utilizaron hojas de diferentes plántulas seleccionadas de forma aleatorizada, se realizaron tres extracciones y se determinaron las actividades de cada una por triplicado, para un total de nueve valores.

3.7. Comportamiento de la actividad fotosintética de las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización.

3.7.1. Evaluación del comportamiento de la actividad fotosintética y la transpiración de las plántulas durante la aclimatización.

En este experimento se utilizaron plántulas con las características descritas previamente (0,31-0,50 g) y plantadas en un sustrato constituido por cachaza + ceniza (1:1, v:v). Las plántulas se colocaron en condiciones de aclimatización

con humedad relativa y luminosidad controladas (90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante los primeros 21 días, luego de esta fecha se trasladaron a condiciones de exteriores (80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) donde permanecieron otros 21 días.

Para la evaluación de la actividad fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) y la transpiración ($\mu\text{mol H}_2\text{O}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) se emplearon siempre hojas completamente expandidas y fotosintéticamente activas (completamente verdes), las mismas se tomaron entre las 9:00 am y 11:00 am. Los momentos de evaluación fueron los siguientes:

- Momento de salida de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*.
- 7 días en casa de cultivo (90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
- 14 días en casa de cultivo (90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
- 21 días en casa de cultivo (90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) **cambio de las condiciones ambientales**
- 28 días (siete días en ambiente natural de 80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
- 35 días (14 días en ambiente natural de 80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
- 42 días (21 días en ambiente natural de 80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

Las mediciones de la fotosíntesis se realizaron con el empleo de un sistema portátil para el análisis infrarrojo de gases (LI-COR 6400, Lincoln, NE) conectado a una fuente de luz LED (6400-02). Las determinaciones se realizaron a humedad relativa y temperatura del aire ambiental. El FFF fue variado, mientras que el CO_2 fue ajustado a $400\ \mu\text{mol mol}^{-1}$ para la determinación de la curva de saturación de la luz.

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con 9 repeticiones por cada tratamiento y tres plántulas por cada repetición. Se evaluó la actividad fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) y la transpiración ($\mu\text{mol H}_2\text{O}\ \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de las plántulas durante la aclimatización.

3.7.2. Efecto de diferentes condiciones ambientales sobre variables del crecimiento y la actividad fotosintética de las plántulas.

En el experimento anterior se observó el efecto que tiene las condiciones ambientales sobre la fotosíntesis, la cual fue baja durante todo el proceso de

aclimatización descrito. Por ello se realizó el presente experimento con el objetivo de evaluar los efectos de las condiciones ambientales (FFF y HR) estables sobre la actividad fotosintética y variables de crecimiento durante 28 días en condiciones de cámara de crecimiento de plantas, con un fotoperíodo de 16 horas luz y temperatura de 25°C durante el día y 18°C en la noche.

Se utilizaron plántulas con las características descritas en experimentos anteriores. Las mismas se colocaron en un sustrato constituido por turba estéril y en cámara de crecimiento de plantas (FITOTRON®), donde se controló la intensidad lumínica (200 y 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la humedad relativa (35 y 75%) durante el tiempo que duró el experimento (28 días), acorde a lo recomendado en el instructivo técnico y por realizarse el experimento bajo condiciones completamente controladas.

Los tratamientos experimentales se establecieron en función de la capacidad máxima de la cámara climatizada en cuanto a FFF (800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y humedad relativa (75%) y un valor inferior a ello de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 35% de humedad relativa, para poder comparar los efectos de diferentes ambientes sobre las variables evaluadas. Los tratamientos experimentales quedaron constituidos de la siguiente forma:

Factor I	Factor II
Luz (FFF, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Humedad Relativa (%)
200	35
200	75
800	35
800	75

A los 28 días de permanecer bajo estas condiciones se evaluaron las variables: masa fresca de las plántulas (g) y masa fresca del follaje (g), número de hijos y la fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las mediciones de la fotosíntesis se realizaron con el empleo de un sistema portátil para análisis infrarrojo de gases (LI-COR 6400, Lincoln, NE.) conectado a una fuente de luz LED (6400-02). Las características del ajuste del equipo fueron similares a las descritas en el experimento anterior.

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con dos factores (FFF y HR) y 20 plantas por tratamiento. Se consideró cada planta como una unidad experimental. Las variables fisiológicas evaluadas fueron:

- Número de hijos/plantas
- Masa fresca/planta (g)
- Masa fresca/follaje (g)
- Fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

3.8. Tratamiento estadístico de los datos.

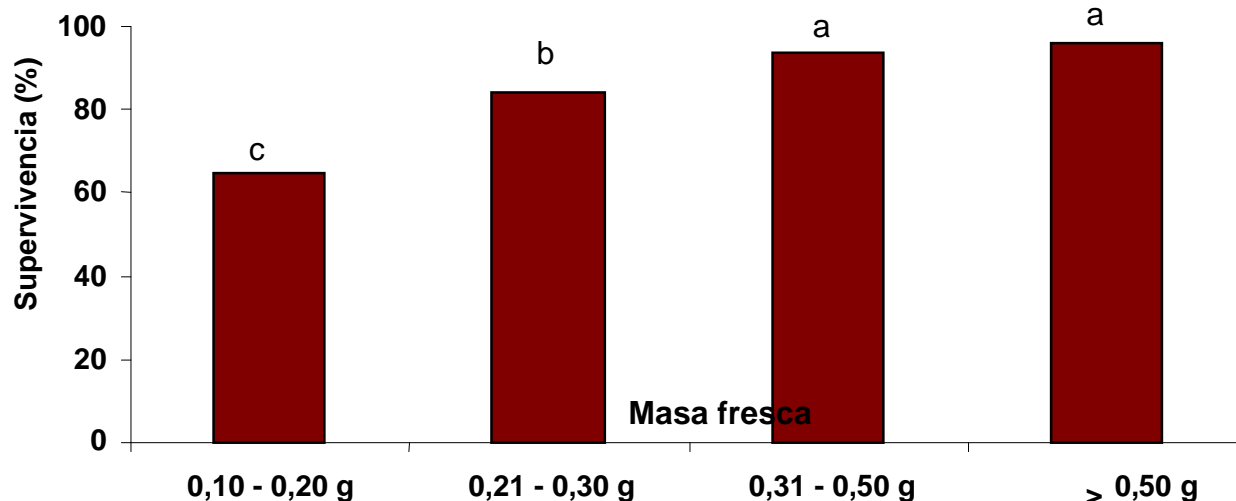
El tratamiento estadístico de los resultados se desarrolló con el empleo del utilitario “*Statistical Package for Social Science*” (SPSS). Se realizaron análisis paramétricos (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $P < 0,05$) después de chequeada la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) y la homogeneidad de las varianzas (Levene, $P < 0,05$) y no paramétricos (Kruskall-Wallis, Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$), luego de transformados los datos y no cumplir con los preceptos de homogeneidad de varianzas y distribución normal. El tipo de procesamiento y transformaciones realizados en cada caso aparecen reflejados en las tablas y figuras del capítulo de Resultados y Discusión. Las variables se transformaron sólo para el análisis estadístico, no para la presentación de los datos.

Durante su ejecución se realizaron varios experimentos clasificados como monofactoriales y bifactoriales. Todos bajo un diseño completamente aleatorizado, donde se cumplió el principio de la diferencia única siempre que fue posible. Esto significa que la única diferencia entre los tratamientos eran los factores que se evaluaban.

4.0. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Efecto de la calidad de las plántulas en el momento de salida de las condiciones *in vitro* a las *ex vitro*.

En la figura 3 se puede observar el efecto de la calidad de las plántulas al momento de salida de los BIT sobre la supervivencia durante la aclimatización.



según $X=2 \arcsen [(\frac{x}{100})^{0,5}]$. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=10$.

Las plántulas que se clasificaron como muy pequeñas (0,11-0,20 g) fueron las que menor porcentaje de supervivencia alcanzaron (65%), con diferencias significativas con el resto de las categorías evaluadas. Aunque este porcentaje de supervivencia supera el 60% que promediaban los laboratorios comerciales cubanos que propagan esta especie al iniciar este trabajo, éste aún no está en correspondencia con los niveles que garantizan una metodología eficiente. No obstante, se conoce que los porcentajes de supervivencias en algunos laboratorios se han incrementado notablemente en los últimos años hasta alcanzar valores entre 85 y 90%.

Las plántulas con masa fresca superior a 0,21 g alcanzaron porcentajes de supervivencia del 86%, que pueden ser considerados como satisfactorios, aunque también se pudo apreciar diferencias significativas con respecto a los tratamientos de mayor calidad, los cuales alcanzaron valores superiores al 90%.

A medida que la masa fresca de las plántulas aumenta, por el desarrollo de sus órganos, éstos son capaces de acumular mayores reservas que pueden ser empleadas en los días siguientes de su traslado a condiciones *ex vitro*, hasta que las mismas emitan el nuevo follaje y el sistema radical para establecer un comportamiento autotrófico.

La calidad de las plántulas está muy influenciada por las condiciones ambientales y los medios de cultivo bajo los cuales se desarrollan *in vitro*. En los protocolos de propagación en BIT se incluye una previa selección del material vegetal al final de la fase de crecimiento y desarrollo, momento en que las de muy baja calidad son eliminadas, otras continúan con nuevos manejos *in vitro* que logren incrementar la calidad y el resto, que se debe corresponder con la mayoría, pasa a la fase de aclimatización. Esta selección al final de la fase de enraizamiento identifica las plántulas competentes para su traslado a condiciones *ex vitro*, o sea aquellas con posibilidades de sobrevivir en los nuevos ambientes y condiciones de cultivo.

Durante la primera etapa de la fase de aclimatización, lo más importante es alcanzar altos porcentajes de supervivencia. Para ello el control de la humedad relativa, la luz y la temperatura a que se transfieren en los primeros días de la aclimatización son de mucha importancia. El manejo que se realice a estos factores junto con el sustrato, son fundamentales para un normal y continuo crecimiento (Van Huylbroeck *et al.*, 1998). Estos aspectos serán evaluados en otros experimentos.

Los resultados corroboran la necesidad de realizar cambios en las fases *in vitro* que proporcionen plántulas con calidad para sobrevivir bajo condiciones *ex vitro*, y de esta forma aumentar la eficiencia del protocolo de multiplicación mediante BIT. Así lo demuestran los trabajos de Xiao *et al.* (2003) cuando estudiaron los efectos de las condiciones fotoautotróficas en BIT sobre plántulas de caña de azúcar, estos autores observaron incrementos significativos en variables de crecimiento con respecto al tratamiento estrictamente heterotrófico.

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de CO₂ e intensidades de flujos de fotones fotosintéticos en condiciones *in vitro*, Kadlecek *et al.* (2001) encontraron en plántulas de café (*Coffea* sp.) que siempre que se emplearon altos flujos de fotones fotosintéticos (250 μmol m⁻²s⁻¹), independientemente de los niveles de CO₂, se alcanzaron los mayores valores en las variables: masa fresca, masa seca, superficie foliar y longitud de los brotes. Cuando las mismas se transfirieron a las condiciones de aclimatización el comportamiento fisiológico fue similar al observado *in vitro*. Lo que indica el valor que tiene el

manejo de las condiciones *in vitro* para lograr mayor calidad en el momento de salida de esta fase.

El incremento de la concentración de CO₂ y la intensidad de la luz en los frascos de cultivo incrementaron la calidad de las plántulas de fresa, lo que ayudó a reducir el tiempo en la aclimatización (Desjardins *et al.*, 1987). Estos tratamientos utilizados en el cultivo en BIT de las plántulas de caña de azúcar de menor calidad, permitirían incrementar la calidad y su empleo en el proceso de aclimatización.

El comportamiento que se observó en los resultados expuestos en la figura 3 no resulta una particularidad para la caña de azúcar, ya que se ha demostrado la relación existente entre la calidad de las plántulas, la supervivencia y el crecimiento de las mismas durante la aclimatización en cultivos tan disímiles como frutales leñosos (Vértesy y Balla, 1987) y piña (*Ananas comosus* (L.)) (Yanes *et al.*, 2000).

En plántulas de piña cv. Cayena lisa provenientes de biorreactores de inmersión temporal, Yanes *et al.* (2000) observaron un marcado efecto de la calidad de las plántulas en el porcentaje de supervivencia. Las que se clasificaron en la menor categoría, de 2,0 a 4,0 cm de longitud y 0,19 g de masa fresca, alcanzaron sólo un 26% de supervivencia durante la aclimatización, mientras que la categoría superior, de 6,0 a 8,0 cm de longitud y 0,63 g de masa fresca, lograron valores superiores al 90% de supervivencia. Los resultados se resumen en que se alcanzan niveles de supervivencia superiores al 90% y una mejor calidad de las plántulas, lo que permitió la reducción del tiempo de permanencia de las mismas en la fase de aclimatización.

Pérez *et al.* (1999) informaron resultados similares a los encontrados en este experimento en cuanto a la supervivencia y la talla de las plántulas de caña de azúcar, en ese caso provenientes de micropropagación convencional. Estos autores lograron sólo 39% de supervivencia en las que se seleccionaron con baja altura; cuando aumentó la calidad, se incrementó notablemente el número de plántulas que sobrevivieron. En los resultados expuestos en éste trabajo se alcanzaron niveles superiores a 60% en las plántulas clasificadas como muy

pequeñas (0,11-0,20 g), lo que sugiere que los BIT mejoran la calidad de las mismas, como lo demostraron Escalona *et al.* (2001) en el caso de la piña.

En función del tamaño de las plántulas de yuca (*Manihot esculenta*) en el momento de salida de la fase *in vitro*, se alcanzaron porcentajes de supervivencia aceptables (76-92%) en la fase de aclimatización (Cabrera *et al.*, 1999). Sin embargo, estos autores descartan la altura inicial como un factor limitante en la aclimatización de esta especie. Sin dudas, la altura no es el mejor criterio de la calidad del material vegetal micropropagado, aún cuando es útil desde el punto de vista práctico, se requiere conocer su relación con otras variables de crecimiento de mayor importancia. Por ello el análisis se realizó en base a la masa fresca de las plántulas y no a la altura, aunque se caracterizaron variables fáciles de evaluar (longitud y número de hojas) de modo que sea posible su empleo en laboratorios comerciales.

Los resultados de la figura 3 muestran que sólo las plántulas que se encuentran en la categoría muy pequeña (0,11-0,20 g), no lograron el desarrollo necesario para ser transferidas a condiciones de aclimatización, lo que se pudo apreciar por los bajos niveles de supervivencia alcanzados. Estas requieren de otros manejos bajo las condiciones *in vitro* para incrementar la calidad. Mientras que las demás categorías lograron adecuados niveles de supervivencia, que las hacen aptas para un eficiente proceso de aclimatización. No obstante, se seleccionaron las de la categoría enmarcada entre 0,31-0,50 g para realizar los posteriores experimentos, por representar la categoría con mayor número de plántulas a la salida de los BIT (43%) y lograr elevados porcentajes de supervivencia.

La calidad es sólo el primer elemento a considerar para alcanzar altos porcentajes de supervivencia, con protocolos dinámicos y eficientes. Sin embargo, otros componentes de las metodologías de aclimatización son muy importantes, entre ellos el sustrato que se utiliza, la intensidad lumínica, la humedad relativa y la temperatura, así como la interacción de éstos.

4.2. Efecto del tipo de sustrato en la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.

En la figura 4 se observa el comportamiento de la supervivencia en los diferentes sustratos que se evaluaron durante la fase de aclimatización.

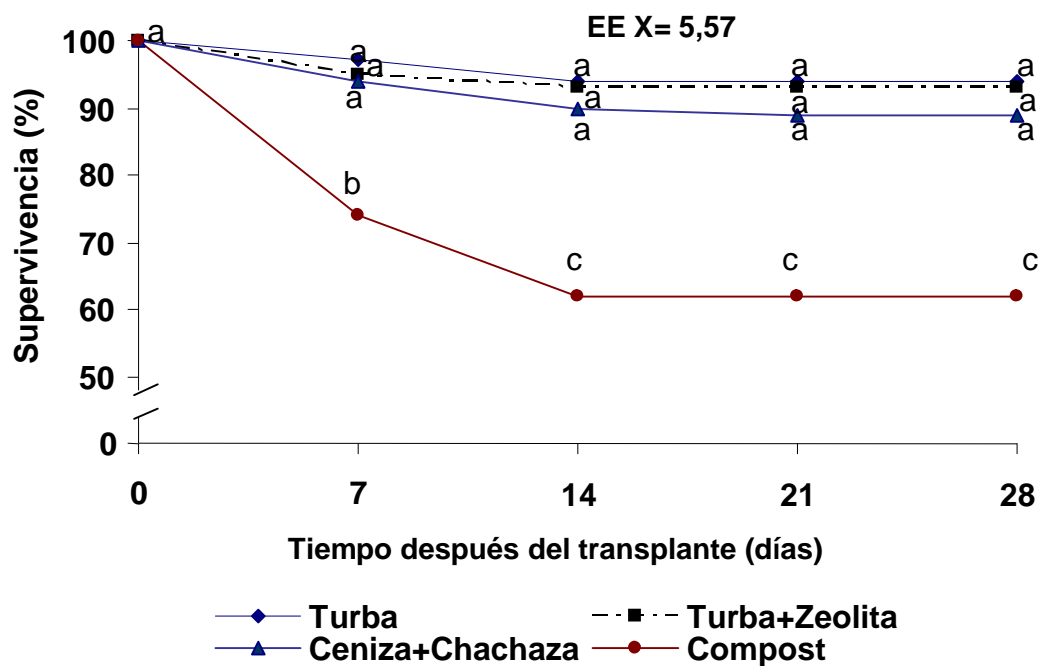


Figura 4. Dinámica de la supervivencia de las plántulas de caña de azúcar en diferentes sustratos en cámara de crecimiento con $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz natural. Para el análisis los datos se transformaron según $X' = 2 \arcsen [(\frac{x}{100})^{0.5}]$. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación doble, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=12$.

Como se puede apreciar, posterior al momento de salida de las condiciones *in vitro* existe una marcada y significativa mortalidad de las plántulas que se encontraban en el sustrato constituido por compost, la cual alcanzó valores de 74% de supervivencia en la evaluación realizada a los siete días en aclimatización; ya a los 14 días éste sustrato registra los más bajos valores con apenas un 62% de supervivencia, donde se observan diferencias significativas respecto a los demás tratamientos, la que se mantuvo hasta el final del experimento. Un comportamiento muy parecido en cuanto a la dinámica de la supervivencia en el tiempo se observó en los demás tratamientos evaluados, aunque con menores niveles de mortalidad y sin diferencias estadísticas entre ellos, los que oscilan entre 89% y 97% de supervivencia, niveles que son considerados aceptables. También se pudo observar que a los 14 días se alcanza la estabilidad de la supervivencia en todos los sustratos evaluados.

En tal sentido, los altos porcentajes de supervivencia que se registran en las plántulas que se establecieron en la mezcla de ceniza con cachaza (87%) la hacen satisfactoria para su empleo en la fase de aclimatización de la caña de

azúcar bajo las condiciones de producción en Cuba. Sobre todo por la disponibilidad de los mismos y los bajos precios con que se adquieren, si se comparan con la turba como un sustrato utilizado universalmente.

Los bajos porcentajes de supervivencia que se observan en el tratamiento del sustrato empleado en las biofábricas especializadas, compuesto por materia orgánica (compost), está motivado por las altas concentraciones de la misma presente en éste sustrato (44%), y por la baja porosidad total (62.38%) que se observó durante su caracterización físico-química (sección Materiales y Métodos tablas 3 y 4). La baja porosidad evaluada en este sustrato, unido a las frecuentes nebulizaciones necesarias para lograr elevados niveles de humedad relativa durante la primera etapa del proceso de aclimatización, provoca mal drenaje e ineficiente intercambio gaseoso, al tiempo que propicia la aparición de enfermedades.

También Pérez *et al.* (1999) pudieron comprobar el efecto de la materia orgánica sobre la supervivencia de las plántulas de caña de azúcar. Estos autores con el empleo de la combinación de humus de lombriz con zeolita como sustrato, lograron altos porcentajes de supervivencia (>90%). Pero en dependencia de los componentes utilizados para la elaboración del humus, existieron diferencias en los niveles de supervivencia, de modo que es mayor la mortalidad mientras mayor contenido de materia orgánica posee el humus.

En el caso de plántulas de plátano, con el empleo de las combinaciones de fibras de coco mezcladas con fibras de caña de azúcar con una longitud de 10 mm aproximadamente, se alcanzaron los mayores porcentajes de supervivencia que cuando se utilizaron ambos componentes por separado (Quesada *et al.*, 1998).

Los resultados alcanzados en este experimento se corresponden con los logrados por Ortiz *et al.* (1998 a) al evaluar diferentes sustratos en la aclimatización y el crecimiento de plántulas de caña de azúcar; estos autores alcanzaron los mayores niveles de supervivencia (>90%) al sustituir sustratos orgánicos individuales (cachaza, humus, compost y turba) por la mezcla de cachaza 40% + litonita 60% (zeolita enriquecida con nutriente). También obtuvieron con este sustrato los mejores resultados en cuanto a las variables fisiológicas evaluadas.

En este experimento, no se evaluaron los efectos que ejercen los distintos sustratos sobre variables del crecimiento, ya que en esta primera etapa lo más importante es alcanzar altos niveles de supervivencia durante la aclimatización. Posterior a ello, la profundización sobre las variables fisiológicas durante todo el proceso es de gran importancia, las que serán discutidas en otros acápite.

Todo ello ha motivado, como se ha podido discutir anteriormente, que se creen alternativas para el empleo de diversos sustratos en la aclimatización de plántulas de caña de azúcar según la disponibilidad de los laboratorios comerciales y el costo de producción de los mismos. Por ello, es importante prestar atención a aspectos como: disponibilidad, homogeneidad y transportación de los sustratos, y de esta forma contribuir al incremento de la eficiencia en los protocolos de micropropagación.

Los resultados logrados hasta el momento demuestran que la calidad del material vegetal en el momento de salida de las condiciones *in vitro*, junto con la mezcla de un sustrato que contenga una adecuada proporción de materia orgánica, se alcanzan altos porcentajes de supervivencia. Cuando lo anterior se logra, es necesario profundizar en

los factores ambientales en que crecerán las plántulas para acelerar el tránsito de las mismas por las áreas especializadas, aspectos que serán tratados a continuación.

4.3. Efecto del flujo de fotones fotosintéticos sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.

La figura 5 muestra el comportamiento de la supervivencia de las plántulas bajo diferentes niveles de intensidades de flujos de fotones fotosintéticos.

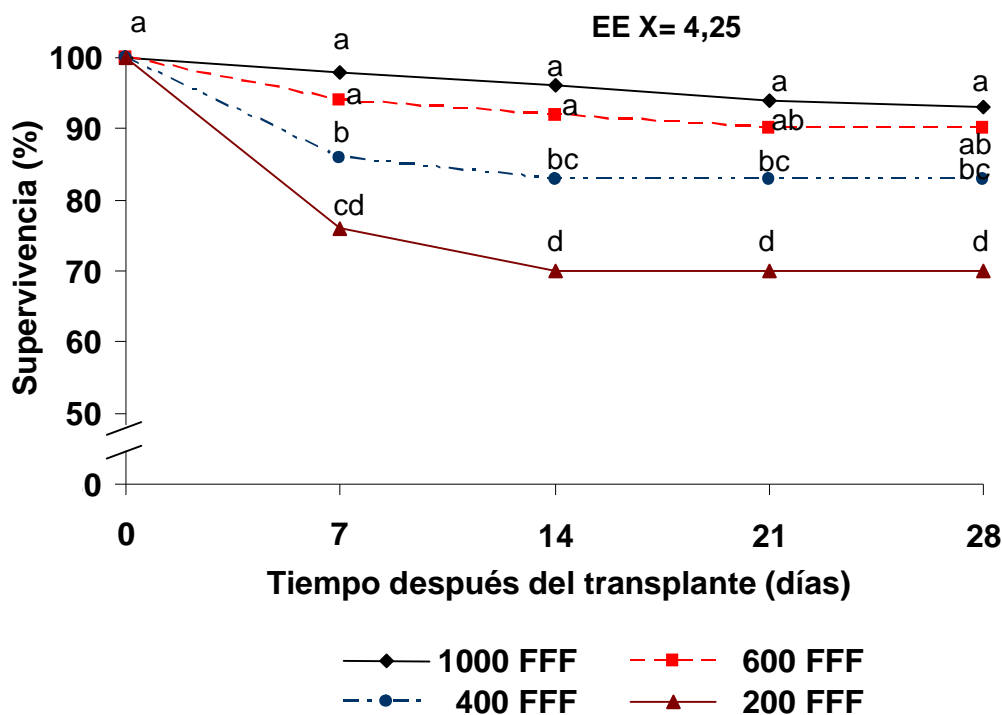


Figura 5. Efecto del flujo de fotones fotosintéticos ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) sobre la supervivencia de plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización Para el análisis los datos se transformaron según $X' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación doble, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=12$.

Los niveles de supervivencia de las plántulas aumentaron con el incremento de los FFF. Los mayores porcentajes de supervivencia logrados al final del experimento, indican que la intensidad lumínica debe mantenerse en un rango superior a los $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, aunque es necesario evitar siempre que altas intensidades provoquen la fotoinhibición del aparato fotosintético. En las plántulas evaluadas no se observó este daño según descripciones precedentes (Van Huylbroeck, *et al.*, 1995), ya que sólo se apreciaron síntomas de deshidratación en las hojas más viejas (hojas provenientes de condiciones *in vitro*).

En los primeros siete días las plántulas sometidas al menor FFF ($200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) alcanzaron sólo 76% de supervivencia, mientras que de las expuestas a FFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sobrevivieron el 86%, ambas difieren estadísticamente de los tratamientos de mayores intensidades de FFF. Diferencia que se mantuvo también en los demás momentos de evaluación en el tratamiento expuesto a menor intensidad de FFF.

La tendencia del comportamiento, en cuanto a la supervivencia, fue similar en todos los tratamientos donde se utilizan los más altos FFF (600 y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Un análisis entre ellos no muestra diferencias estadísticas durante todo el proceso. En los primeros siete y 14 días entre los niveles de 1 000 y 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con los de 400 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se aprecian diferencias estadísticas, lo que indica que también la luz tiene un marcado efecto en las dos primeras semanas luego del trasplante hacia las condiciones de aclimatización. Posterior a los 21 días los valores no muestran diferencias estadísticas entre los tratamiento de 600 y 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Los bajos niveles de supervivencia alcanzados por las plántulas que permanecieron en la intensidad lumínica más baja, puede relacionarse con la incapacidad de cierre de los estomas que permite una mayor transpiración, unido a las insuficiencias del aparato fotosintético en los primeros momentos del traslado desde la condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Bajo intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ es posible que no se alcance el umbral para el cierre fotoactivo de los estomas y por ello éstos continúan abiertos, lo que puede incrementar la transpiración y la mortalidad de las plántulas. A medida que se incrementa los FFF se favorece la señal para el estímulo de cierre fotoactivo.

Los BIT pueden estimular una mayor funcionalidad de las estructuras de la planta producto de los cambios en el ambiente interno de los frascos de cultivo. Además es de destacar que la caña de azúcar es una planta C_4 , y están adaptadas a soportar condiciones de estrés.

Los resultados logrados en este experimento permiten valorar la importancia del incremento de la intensidad lumínica durante el proceso de aclimatización en las plántulas de caña de azúcar para garantizar altos porcentaje de supervivencia.

La morfología que desarrollan las plántulas *in vitro* (Preece y Sutter, 1991) las hacen muy susceptibles a la desecación drástica. Ella es la causa principal de mortalidad, y por ende un factor clave que debe controlarse en una metodología de aclimatización desde los primeros momentos de exponer las mismas a condiciones que puedan provocar estrés abiótico. Aunque en los BIT los cambios reiterados de los ambiente pudieron estimular un cambio del heterotrofismo a mixotrofismo y con ello un mejor desarrollo de los órganos de la caña de azúcar.

El principal problema que afecta las plántulas durante la aclimatización es el control estricto de la transpiración durante los primeros días de su traslado a estas condiciones. Él es fundamental para alcanzar altos porcentajes de supervivencia, dificultad atenuada por los tratamientos fotomixotróficos en condiciones *in vitro* (Jeong-Hoo *et al.*, 2000). Aunque existen resultados que demuestran que las plántulas no responden eficientemente al tratamiento de fotomixotrofismo, lo cual está muy estrechamente relacionado con la especie en cuestión y las condiciones experimentales a que se someten (Kozai y Zobayed, 2000).

En plántulas de *Spathiphyllum*, Van Huylbroeck *et al.* (1998) observaron que la concentración de carbohidratos endógenos se incrementó después de una semana de cultivo *in vitro* al elevar los FFF a 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Tal incremento lo asocian con la mayor transpiración de las plántulas en los frascos de cultivo y con una mejor y mayor absorción de componentes del medio de cultivo, incluidos carbohidratos. Lo que demuestra la eficiencia del incremento de los

FFF desde esta etapa para alcanzar plántulas con mayores reservas en sus órganos que permitan incrementar los porcentajes de supervivencia en las condiciones *ex vitro*.

Sin lugar a dudas, el manejo de la luz debe comenzar bajo las condiciones *in vitro* para favorecer el llamado cultivo fotomixotrófico, propio de lo que en la actualidad se conoce como aclimatización *in vitro* (Ziv, 1995). Esto permitiría elevar la calidad de las plántulas y con ello un mayor desarrollo de sus órganos.

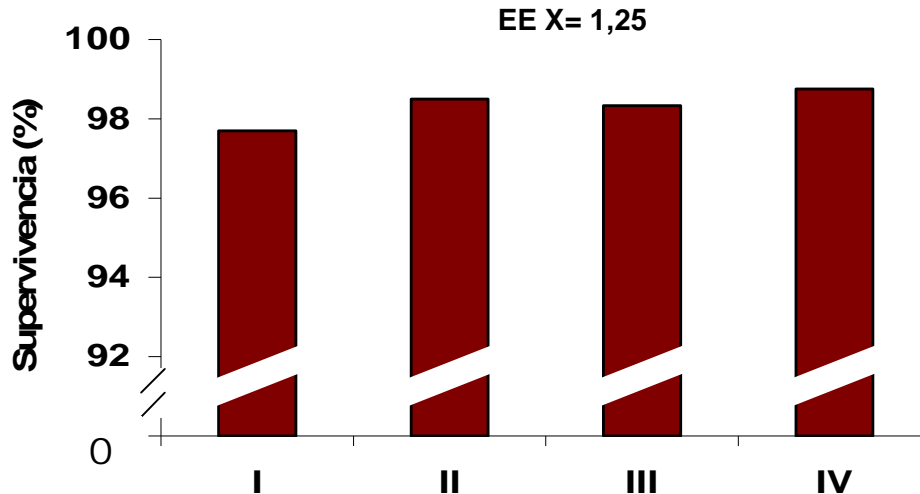
En caña de azúcar se ha podido observar que en los primeros 14 días deben tomarse las medidas que eviten la transpiración descontrolada, característica del material que entra en esta fase proveniente de condiciones *in vitro* (Yue *et al.*, 1992; Ziv, 1995; Donnelly *et al.*, 1995), para lo cual es determinante la alta humedad relativa, unido a la adecuada selección y tratamiento del sustrato, de modo que evite las infecciones fatales de las plántulas. Sin embargo, se requiere su reducción gradual, unida al manejo de la luz, de modo que favorezcan la formación y funcionalidad de estructuras que se involucran en el control de las relaciones hídricas y en el incremento de la actividad metabólica conducente al autotrofismo (Desjardins *et al.*, 1996; Kozai y Zobayed, 2000).

Los altos porcentajes de mortalidad que se alcanzan en la fase de aclimatización están relacionados con dos causas fundamentales, la primera es que las plántulas en el momento de salida de las condiciones *in vitro* no presentan las características idóneas para ser trasladadas directamente a exteriores. La otra causa es que no se realiza un control adecuado de las condiciones ambientales que permitan disminuir estas pérdidas.

Como se ha demostrado, la calidad de la plántula en la salida de las condiciones *in vitro*, el sustrato y la intensidad lumínica, son variables que inciden directamente en alcanzar porcentajes de supervivencia superiores al 95%. No obstante, el verdadero éxito en la aclimatización radica en el manejo adecuado de la combinación que a los mismos se le da como un sistema o conjunto.

4.4. Efecto de la reducción de la humedad relativa y el incremento de los FFF sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.

La figura 6 muestra los efectos que ejerce las variaciones en las condiciones ambientales sobre la supervivencia durante la aclimatización.



I	II	III	IV
(HR%; FFF $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	(HR%; FFF $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	(HR%; FFF $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	(HR%; FFF $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
90%; 1000 FFF	95%; 600 FFF	95%; 600 FFF	90%; 1 000 FFF
90%; 1000 FFF	90%; 1 000 FFF	80%; 2 000 FFF	80%; 2 000 FFF

Figura 6. Comportamiento de la supervivencia de las plántulas de caña de azúcar y las variaciones de las condiciones ambientales durante la aclimatización. **Para el análisis los datos se transformaron según $X' = 2 \arcsen [(x/100)^{0,5}]$. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=10$.**

En la figura se observa que los porcentajes de supervivencia de las plántulas no variaron significativamente y fueron en todos los casos superiores a 97%. Esto es indicativo de la eficiencia que se logra con el manejo de las condiciones ambientales.

Los resultados evidencian además el valor de la selección en el momento de salida de las condiciones *in vitro* para garantizar altos porcentaje de supervivencia durante la aclimatización. La similitud en cada tratamiento permite plantear que las plántulas de caña de azúcar lograron una rápida adaptación a las condiciones a que se expusieron luego de su traslado desde las condiciones *in vitro*. Estos fueron atenuados por la acertada combinación de factores, en especial la alta humedad relativa, combinado con los niveles de FFF que se logró durante los primeros momentos en todos los tratamientos.

El valor del incremento de la intensidad lumínica y la disminución gradual de la humedad relativa en la aclimatización de la caña de azúcar, también fue demostrado por Yanes *et al.* (2000) en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.). Estos autores a medida que se elevaron paulatinamente los flujos de

fotones fotosintéticos y se redujo la humedad relativa durante todo el proceso, alcanzaron porcentajes de supervivencia superiores al 90% y disminuyó en 30 días el período de aclimatización. En general se reconoce que el tránsito de ambientes *in vitro* a *ex vitro* y variaciones en estas condiciones, provocan estrés en las plantas, expresados en términos de acumulación de ABA, prolina y especies activas del oxígeno (Van Huylbroeck *et al.*, 1995; Hronková *et al.*, 2003; Talbott *et al.*, 2003; González-Olmedo *et al.*, 2005).

En especies frutales también la calidad de las plántulas resultó determinante en la reducción de las pérdidas durante la aclimatización, ya que fue inferior cuando poseían raíces, siempre que permanecieron bajo sistema de riego que garantizó tanto el tiempo como la duración de la nebulización, factores que propiciaron la humedad relativa necesaria en estos primeros momentos. El manejo de estas condiciones por espacio de tres semanas fue suficiente para el endurecimiento de las plántulas y su salida a las condiciones naturales. Sin embargo, con períodos de irrigación más espaciados y traslados antes de las tres semanas la supervivencia se redujo al 57% (Vértesy y Balla, 1987).

El tiempo de permanencia de las plántulas en las casas de aclimatización es un factor importante. Los manejos que en ellas se realicen permitirán el rápido tránsito de las mismas sin comprometer su supervivencia y calidad comercial, al cumplir el papel que les corresponde en una tecnología de propagación acelerada, que básicamente es rectificar las deficiencias de los órganos de la planta desarrollados en condiciones *in vitro*.

No obstante a que no se observan diferencias significativas entre los tratamientos experimentales evaluados en cuanto a los niveles de supervivencia, se pudo constatar el positivo efecto de los ambientes estudiados sobre algunas variables fisiológicas (Tabla 6).

Tabla 6. Efectos de los diferentes manejos ambientales sobre el incremento en masa fresca y el número de hojas activas e hijos en plántulas de caña de azúcar propagadas en BIT.

Tratamientos HR(%); FFF + HR(%); FFF	Masa fresca (g)	Hojas activas	N ₀ hijos
95; 600 + 90; 1 000	5,99 c	4,50 c	0,25 c

95; 600 + 80; 2 000	7,42 a	6,06 a	0,49 b
90; 1 000 + 90; 1 000	6,54 b	5,24 b	0,28 c
90; 1 000 + 80; 2 000	8,18 a	5,81 ab	0,76 a
EE X	0,41	0,29	0,10

Los datos de N° de hijos se transformaron para el análisis según $X'=(x+0,5)^{0,5}$ (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=10$.

La influencia del ambiente exterior (80% HR y 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) es mayor que en el resto de los tratamientos experimentales, ya que su combinación tanto en las condiciones de 95% HR y 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ como con los 90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ siempre fue significativamente superior. El manejo de las plántulas comenzando por las condiciones de 90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y finalizando en 80% HR y 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, resultó la mejor combinación para estimular el crecimiento de las mismas con mayor rapidez.

De modo que la luz debe ser menos intensa sólo en los primeros días, al considerar la baja actividad metabólica que realizan las plántulas en esos momentos (Yue *et al.*, 1993; Van Huylenbroeck y Debergh, 1992; Seon *et al.*, 2000; Estrada-Luna *et al.*, 2001). Sin embargo, una vez que se logra la adaptación y la capacidad para desarrollar procesos fotosintéticos, motivados entre otros aspectos por la nueva emisión y desarrollo de los órganos que realizan esta función, las mismas pueden ser transferidas a exposición plena de la luz en condiciones naturales ya que este ha sido un factor favorable para incrementar las tasas de crecimiento de las plantas.

Este es un aspecto importante para acelerar el tránsito de las plántulas por el área de aclimatización. Una vez que se logren altos porcentajes de supervivencia, éstas crecerán rápidamente si los ambientes estimulan sus potencialidades y aprovechan sus posibilidades metabólicas. De esta forma se hace más eficiente el proceso de propagación y se utiliza con mayor frecuencia las instalaciones especializadas que se dedican a estos fines.

La caña de azúcar es una especie que demanda altas intensidades lumínicas para ejercer plenamente su capacidad fotosintética. Los bajos valores de supervivencia alcanzados por las que fueron sometidas a intensidades lumínicas menores (Figura 5) demuestran la necesidad de un adecuado manejo durante su cultivo.

En plántulas de *Calathea* en condiciones de aclimatización, se observó fotoinhibición a bajas intensidades lumínicas cuando estuvieron presentes factores estresantes adicionales como son baja o alta temperatura, déficit

hídrico, etc. (Van Huylbroeck *et al.*, 2000). Esto quizás motivado por la pobre diferenciación de los cloroplastos de las hojas que se emiten en condiciones *in vitro*, que junto con un estrés adicional luego del transplante a condiciones *ex vitro* resulta en una mayor susceptibilidad a los cambios de intensidad lumínica. En el caso de la caña de azúcar, estos factores estresantes adicionales se minimizaron para asegurar una rápida y mejor adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

Durante los primeros 20 días en aclimatización se observó que el incremento de la intensidad de flujos de fotones fotosintéticos de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, estimuló el número y longitud de las raíces, así como la masa fresca y seca de los brotes en plántulas de *Calathea*, incrementos que se mantuvieron estables hasta el final del experimento (Van Huylbroeck *et al.*, 1998). Aunque en el caso de la caña de azúcar no se evaluó el efecto del ambiente en el tiempo, sí se pudo constatar su marcado efecto en las variables fisiológicas evaluadas a los 42 días.

Moore y Maretzki (1999) en plantas de caña de azúcar adultas, registraron incrementos en la actividad fotosintética con aumentos de la intensidad lumínica y a exposición plena de la luz solar. Durante la aclimatización, el incremento de los FFF también estimuló la supervivencia de las plántulas y las variables del crecimiento.

Por lo general, en condiciones de saturación de luz, la fotosíntesis de la caña de azúcar y otras plantas C_4 es de dos a cuatro veces mayor que la de las plantas C_3 . En cuanto a la relación fotosíntesis/respiración, como un elemento importante en la acumulación de biomasa en la planta, también existen diferencias entre las especies C_3 y C_4 en los gastos respiratorios de los fotosintetatos. En particular la caña de azúcar presenta una elevada fijación de CO_2 , la que se asocia a una menor actividad respiratoria (Rodés y Hieke, 1987).

Los resultados antes expuestos demuestran nuevamente que los diferentes manejos de las condiciones ambientales no muestran diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de supervivencia, pero sí se observó su efecto en las variables de crecimiento evaluadas. Luego que las mismas se han recuperado del estrés ambiental a que se someten, la exposición a ambiente

natural estimuló la emisión de hojas e hijos y con ello al incremento de la masa fresca. Por ello es que se seleccionó el ambiente que incluye el empleo de 90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en la primera etapa (0-28 días) y posteriormente ser transferidas a ambiente de 80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en la segunda etapa (28-42 días).

Otro aspecto importante durante la aclimatización, es tratar de reducir el tiempo de permanencia de las plántulas en esta fase, ya que con ellos se alcanza mayor eficiencia productiva. Además, se pueden utilizar con mayor frecuencia las casas de cultivo lo que contribuye grandemente a incrementar la rentabilidad en los protocolos de micropropagación.

4.5. Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado a ambiente natural.

En la figura 7 se puede observar el efecto del momento de traslado de condiciones ambientales controladas a condiciones ambientales naturales sobre los porcentajes de supervivencia de las plántulas de caña de azúcar.

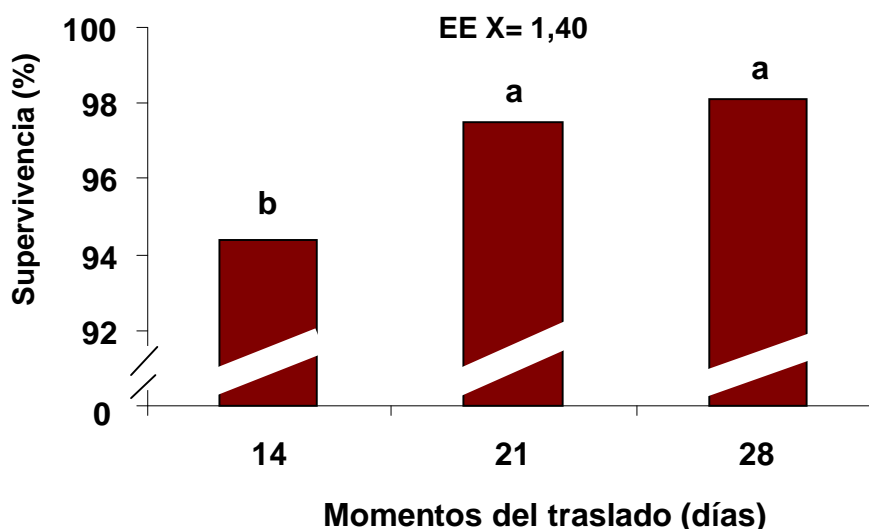


Figura 7. Efecto del momento de traslado a condiciones de exteriores en la supervivencia de plántulas de caña de azúcar. **Para el análisis los datos se transformaron según $X' = 2 \arcsen [(x/100)^{0,5}]$. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=10$.**

En las plántulas transferidas de ambiente (90% HR y $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a los 14 días se apreció diferencia significativa con relación a los otros tratamientos experimentales, aunque las mismas alcanzan niveles de supervivencia superiores a 94%. Entre los momentos de 21 y 28 días, no se observaron diferencias

estadísticas, y se aprecian valores de supervivencia superiores al 97%. Por ello se escoge los 21 días como el momento de traslado desde las condiciones controladas a las naturales.

Para elevar los niveles de supervivencia en la fase de aclimatización, el ambiente debe ser manipulado de forma tal que, al comienzo se simulen las condiciones ambientales bajo las que se cultivaron las plántulas *in vitro*. Luego se realizará un cambio gradual de las mismas, hasta que en la etapa final del proceso el ambiente sea lo más semejante posible al que se transferirán en condiciones de campo, lo que permite que las plántulas se adapten con facilidad al cambio y así evitar el daño o muerte una vez que son trasladadas de las casas de cultivo (Kozai y Zobayed, 2000).

En el caso de la caña de azúcar el tiempo de permanencia de las plántulas en las casas de cultivo se logró reducir en siete días, lo que permite un mayor empleo de éstas instalaciones. También Ortiz *et al.* (1998 a) redujeron en 10 días el tiempo de aclimatización en plántulas de caña de azúcar en otras condiciones ambientales y con el empleo de un adecuado sustrato (cachaza + zeolita) que estimuló el crecimiento de las mismas.

Los resultados alcanzados hasta el momento demuestran el efectivo manejo de los factores antes estudiados, los que integrados logran porcentajes de supervivencias del 98% en plántulas de caña de azúcar. No obstante a estos resultados, la profundización en los aspectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos es de gran importancia para tomar decisiones durante el proceso de aclimatización. Las cuales deben estar en correspondencia con alcanzar óptimas condiciones ambientales y de cultivo que estimulen altos porcentajes de supervivencia y una rápida transición por la fase de aclimatización.

4.6. Evaluación de las características morfo-fisiológicas de las plántulas durante la aclimatización.

4.6.1. Evaluación de indicadores morfológicos de la calidad de las plántulas.

En la figura 8 se muestra el desarrollo de algunas variables fisiológicas durante el proceso de aclimatización en las plántulas de caña de azúcar.

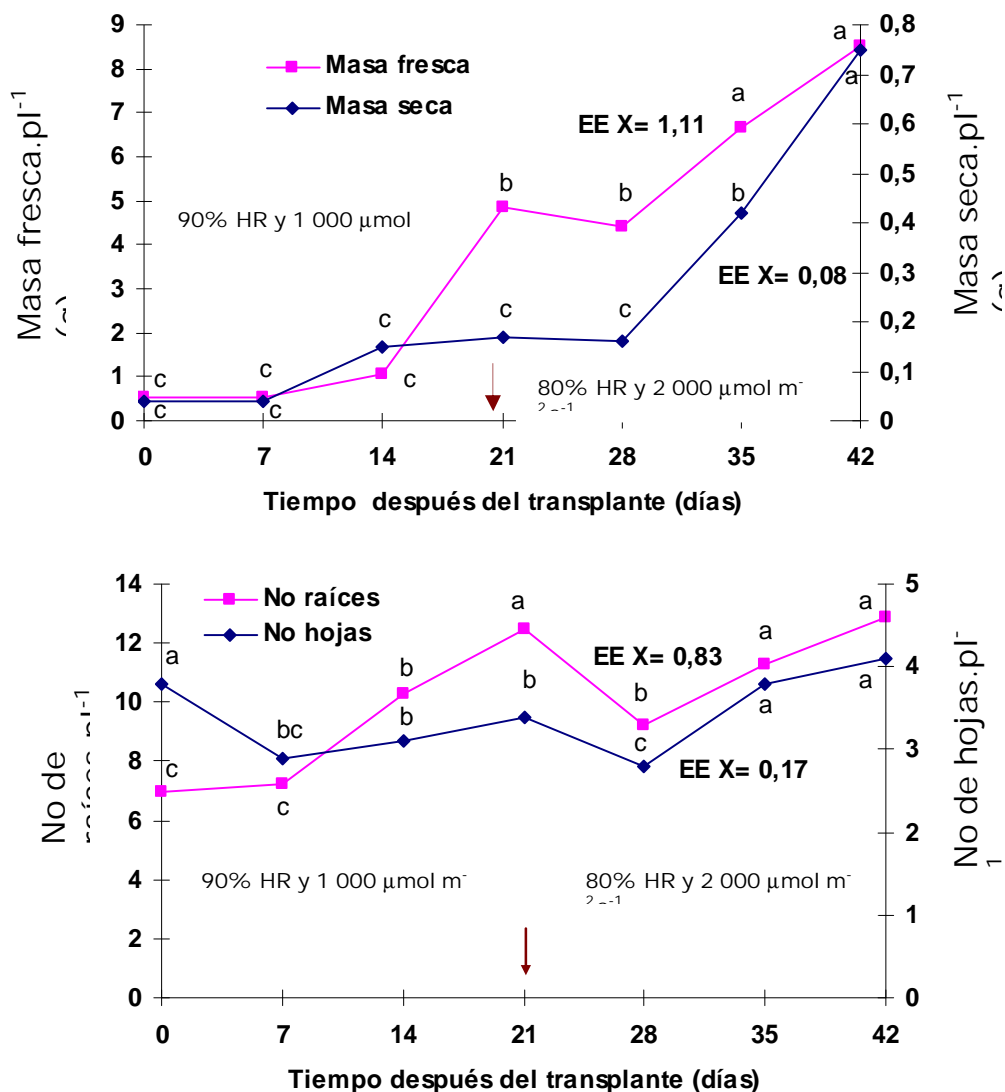


Figura 8. Comportamiento de variables de crecimiento de las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatación. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=20$. La flecha indica el momento del cambio de las condiciones ambientales

Posterior a los siete días de transferidas hacia las condiciones de aclimatación, no se observaron cambios en la mayoría de las variable de crecimiento que se evalúan. No obstante se apreció una reducción significativa del número de hojas desde el momento de salida de las condiciones *in vitro* de 3,80 a 2,90 a los siete días del traslado a condiciones *ex vitro*, probablemente debido a muerte por deshidratación por el mal funcionamiento de los órganos en esta primera etapa.

En el intervalo de 7 a 14 días, la masa seca se cuadruplicó con incrementos en los valores desde 0,04 a 0,15 g, mientras la masa fresca fue sólo duplicada desde 0,52 a 1,04 g sin diferencias significativas en ambas variables. Estos incrementos en las masas están directamente relacionados con la emisión del nuevo sistema radical, el cual mostró diferencias significativas en este intervalo con incrementos desde 7,20 a 10,30 raíces por planta.

El significativo incremento que se aprecia entre los 14 y 21 días, en algunas variables, es indicativo de la adaptación a los ambientes logrados en las casas de cultivo. Bajo esta premisa se justifica un nuevo cambio que acelere el crecimiento de las plántulas, por ello las mismas fueron trasladadas a condiciones climáticas semejantes a los campos donde se cultivarán.

Cuando las plántulas se trasladaron a condiciones de ambiente natural (21 días) se observó un decrecimiento algunas variables. El número de raíces y el número de hojas son los órganos que más se afectan, con diferencias estadísticas con el momento que le precedió, no siendo así en los valores de las masas, las que pudo estar relacionadas a un mayor desarrollo alcanzado por las raíces y las hojas en este momento. Las nuevas y adversas condiciones ambientales a que se transfieren las mismas con incrementos en las intensidades lumínicas y reducción de la humedad relativa, hacen que los órganos se afecten con una marcada influencia en el número de hojas y el número de raíces.

Con sólo siete días posteriores al cambio de ambiente (35 días), se observan significativos incrementos en todas las variables de crecimiento, los que se mantienen en ascenso hasta los 42 días, momento en que las plantas fueron transferidas a condiciones de campo.

Estrada Luna *et al.* (2001) en plántulas de ají (*Capsicum* sp.) propagadas convencionalmente, encontraron que el contenido de agua se redujo un 15% en sólo los dos primeros días posteriores al transplante a las condiciones *ex vitro*. Sin embargo, en caña de azúcar la reducción de las masas fresca y seca no mostró diferencias significativas en los primeros 14 días, presumiblemente por un mejor desarrollo de los órganos foliares de las plántulas bajo las condiciones de cultivo en BIT.

En plántulas de *Calathea* durante la fase de aclimatización se ha demostrado, que a medida que se incrementan los tratamientos de intensidad lumínica, las raíces se incrementaron y fueron de mayor longitud, mientras que en *Spathiphyllum* se observó distinto comportamiento (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000). Los resultados demuestran que existió un adecuado desarrollo en el sistema radical durante la aclimatización en caña de azúcar y se aprecia que las disminuciones se causaron en los momentos en que se trasladaron de condiciones ambientales.

En caña de azúcar el número de hojas verdes en plantas jóvenes es limitado. En el máximo desarrollo el número de hojas fotosintéticas es aproximadamente 10. También la emisión foliar es influida por las condiciones de crecimiento y la variedad, ésta puede durar de una a tres semanas (Van Dillewijn, 1951). La formación de las nuevas hojas tiene gran dependencia de la temperatura y a su vez el desarrollo que alcanzan está muy relacionado con la posición de las mismas en la planta.

Las hojas como principal órgano encargado de la formación de fotosintetatos para el normal desarrollo de las plántulas, bajo las condiciones *in vitro*, se emplean sólo como almacén de sustancias carbonadas que son útiles en el crecimiento y desarrollo de las mismas luego que se transfieren a condiciones *ex vitro*. En estas condiciones se mantiene la función de reserva, hasta tanto no exista una nueva emisión foliar con mejores características anatomorfológicas que le garanticen funciones metabólicas más eficientes (Van Huylenbroeck y De Riek, 1995).

En plántulas de *Spathiphyllum* durante la aclimatización se observó un incremento en los niveles de almidón, fructosa y glucosa, así como en la actividad enzimática de las invertasas ácidas y de la sacarosa sintasa en los

primeros días en la fase de aclimatización (Van Huylenbroeck y De Riek, 1995). Esto evidencia la movilización de las reservas que poseían los órganos encargados de esta función. Cuando aparecieron las nuevas raíces y hojas disminuyeron estas movilizaciones, mientras disminuía la actividad de las invertasas. Por el contrario, estos factores favorecieron la actividad biosintética que motivó que la masa estuviese estrechamente relacionada con el número de nuevas raíces y hojas emitidas, estas últimas muy involucradas por la activación de los pigmentos fotosintéticos que poseen, en particular las clorofilas (Van Huylenbroeck y Debergh, 1992).

Grannoum *et al.* (2000) observaron incrementos en variables de crecimiento y desarrollo en plantas C₄ sometidas a altos niveles de CO₂ e intensidades de luz bajo condiciones de casas de cultivo. También en plantas de ají evaluadas durante la aclimatización se observó que se incrementaron las variables área foliar, masas fresca y seca de la planta posterior al sexto día de permanencia en esta fase y que este incremento fue más marcado posterior a los 12 días (Estrada-Luna *et al.*, 2001).

Van Huylenbroeck *et al.* (1998) en plantas de *Spathiphyllum* y *Calathea* provenientes de un medio de cultivo semisólido, encontraron altos incrementos en la masa seca después de los 20 días en la fase de aclimatización. Similares incrementos se observaron a los 14 días en las plántulas de caña de azúcar propagadas en BIT, cuando las nuevas hojas y raíces comenzaron a aparecer luego de la recuperación del estrés ambiental a que se expusieron.

En las plantas, durante la ontogenia de las hojas se enmarcan dos fases fotosintéticas distintivas: la primera fase muestra incrementos continuos de la actividad fotosintética, la cual tiene estrecha relación con la expansión foliar, y una segunda fase de declinación de los rangos fotosintéticos, la que se asocia a la senescencia de las hojas, se reconoce además un máximo de fotosíntesis entre estas dos fases (Miller *et al.*, 1997). Durante la aclimatización de la caña de azúcar la primera de estas fases presumiblemente comenzó a manifestarse en las últimas semanas del proceso estudiado, con la necesaria interconexión de órganos, en este caso mayor número de hojas y de raíces, que juntos garantizaron los más altos valores de masas fresca y seca evaluados en todo el experimento.

En evaluaciones realizadas a plántulas de caña de azúcar en condiciones de aclimatización, Ortiz *et al.* (1998 a) cuantificaron valores en masa fresca y masa seca de 3,80 g y 0,49 g respectivamente a los 45 días. Mientras que bajo las variaciones de las condiciones experimentales (90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de FFF durante los primeros 21 días y luego 80% HR y 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de FFF otros 21) a que se someten las plántulas se alcanzan valores de 8,53 g de masa fresca y 0,75 g de masa seca. Lo que demuestra el efecto del incremento paulatino de la intensidad lumínica y la reducción de la humedad relativa.

Los resultados alcanzados en este experimento muestran que con un manejo adecuado de las condiciones ambientales se logra un positivo efecto en las variables de crecimiento en las plántulas de caña de azúcar y que las mismas se recuperan rápidamente del estrés ambiental a que se exponen durante todo el proceso de

aclimatización. La emisión de nuevas raíces fue las variables que más incidió en los incrementos que se observó en las masas frescas.

El desarrollo que puede alcanzar el follaje de las plántulas es muy importante para obtener mayor actividad metabólica en esta fase. En la figura 8 se muestra el comportamiento del superficie foliar de la planta y la densidad estomática de las hojas completamente expandida bajo las condiciones ambientales a que se exponen las mismas durante la etapa de aclimatización.

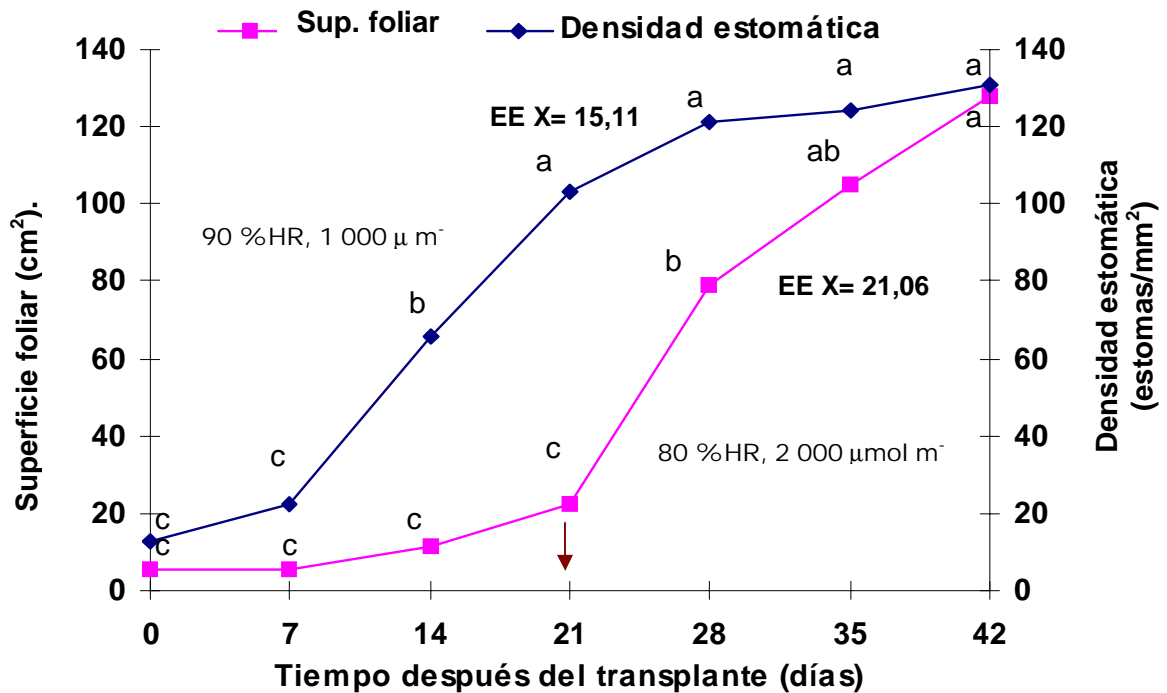


Figura 9. Comportamiento de la superficie foliar y la densidad estomática de la superficie abaxial durante la aclimatización de las plántulas de caña de azúcar. Los datos se transformaron para el análisis según $X'=(x)^{0.5}$. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=20$. La flecha indica el momento del cambio de las condiciones ambientales.

Durante los primeros 21 días del período de aclimatización, las hojas de las plántulas de caña de azúcar mostraron incrementos en la superficie foliar, que fue tres veces (5,23 a 22,05 cm²) el área inicial. Posterior a este momento el incremento de la superficie foliar fue significativamente mayor, sólo siete días después de transferir las plántulas a condiciones de ambiente natural, los valores de la misma se incrementan más de tres veces a los registrados en la evaluación de los 21 días y aunque sin diferencias significativas con los valores obtenidos en la posterior evaluación (35 días), continúan en ascenso el crecimiento del superficie foliar hasta los 42 días bajo condiciones de ambiente natural.

Por otro lado, la densidad estomática comienza a aumentar desde el momento en que las plántulas se transfieren de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Este aumento no

mostró diferencias significativas durante los primeros siete días en aclimatización. A los 14 días se encontraron diferencias estadísticas con respecto a la fecha que le precedió y a la evaluación que se realizó a los 21 días. Luego de esta fecha y hasta el final del experimento no se encuentran diferencias significativas.

La superficie foliar es una de las variables más importante en los cultivos debido a sus funciones metabólicas. La misma depende del número de hojas que se emiten y la superficie que logran alcanzar estas hojas. El desarrollo foliar tiene una relación directa con las condiciones ambientales en que crecen las plantas; la luz y la temperatura son variables importantes en la expansión de la misma (Robertson *et al.*, 1998). Este efecto se comprobó también durante el tránsito de las plántulas de caña de azúcar por la fase de aclimatización.

El incremento de la intensidad lumínica estimuló significativamente la superficie foliar (49%) de plántulas de fresa después de 30 días en condiciones de aclimatización (Desjardins *et al.*, 1987). En caña de azúcar se pudo comprobar que a partir de los 21 días en aclimatización es que se logra este incremento en la expansión foliar, el cual está relacionado con el aumento de los FFF.

El significativo incremento se observó en la superficie foliar cuando las plántulas fueron transferidas desde las condiciones de casa de cultivo a ambiente natural (21 días), justifica por qué aunque decrecían los valores de las variables número de raíces y hojas (Figura 8), no se encontraron diferencias significativas en las masas fresca y seca en la evaluación realizada a los 28 días.

En plantas de caña en estado juvenil el número de hojas verdes es limitado (10 aproximadamente). La emisión de nuevas hojas esta influenciada por las condiciones de crecimiento y la variedad. La reducción del número de hojas entre 21 y 28 días (Figura 8), aunque significativa para esta variable es de 3,40 a 2,80 (0,6 hojas), lo que indica que no existió una gran pérdidas. Mientras que en las hojas jóvenes se estimuló su desarrollo foliar con el cambio a mayor intensidad de FFF, quizás motivado por la mejor calidad que aporta la luz natural.

El desarrollo de la superficie foliar de la caña de azúcar bajo condiciones ambientales naturales, que favorezcan el mismo, se ha visto afectado por las condiciones de luminosidad a que se han expuesto las plantas. Cuando ellas se exponen a altas intensidades lumínicas se alcanzan hasta 11 000 cm², mientras que en condiciones de baja luminosidad se alcanzan apenas 7 000 cm² (Van Dillewijn, 1951). Tendencia similar se ha evidenciado en los resultados del presente trabajo.

La densidad estomática de las hojas en condiciones *in vitro* fue mayor en plantas de manzana (Blanke y Belcher, 1989) y rosa (Capellades *et al.*, 1991), pero menor en ciruelo (Brainer y Fuchigami, 1981) y tabaco (Ticha *et al.*, 1999) cuando se comparan con las que crecen en condiciones *ex vitro*. La densidad estomática también incrementó durante la aclimatización en *Prunus serotina* (Drew *et al.*, 1993) y *Rhododendron* (Waldenmaier *et al.*, 1990). Por otro lado, un incremento en la densidad estomática se encontró en plántulas de fresa que crecieron en ambientes enriquecidos de CO₂ y altas intensidades lumínicas bajo condiciones *in vitro* (Desjardins *et al.*, 1988).

El análisis de la densidad estomática indica el desarrollo que alcanzan estos órganos en el tiempo y con ello ganan la necesaria funcionalidad que se requiere para la actividad fotosintética, pues en las últimas semanas se aprecia una estabilidad de esta variable, asociada a la madurez que logran las hojas.

La densidad estomática en caña de azúcar difiere en función de la variedad, de factores externos como la luz, la temperatura y la humedad (Marín *et al.*, 1988). Cuando se evaluó el comportamiento de la densidad estomática en la variedad POJ 100 con 10 meses de edad bajo condiciones de campo, se encontraron densidades de 258 estomas/mm² en la parte inferior de la epidermis y una densidad total de 370 estomas/mm² (Van Dillewijn, 1951).

Luego del cambio de ambiente que se realizó a los 21 días, la densidad estomática alcanza valores superiores a 120 estomas/mm², sin diferencias significativas con los valores cuantificados a los 42 días. Esto indica la posible estabilización de densidad estomática bajo estas condiciones, si se comparan las mismas con las plantas adultas de POJ 100 en condiciones de campo (258 estomas/mm²).

La densidad estomática de las hojas depende de la especie, pero tanto ella como las características de los estomas responden a las condiciones de cultivo (Blanke y Belcher, 1989), lo que evidencia el positivo efecto que se alcanzó con la densidad estomática de las hojas con el manejo del ambiente propuesto en este trabajo.

En condiciones *in vitro* las plantas presentan menor número de estomas, que además son infuncionales producto de las condiciones ambientales a que están expuestas (Ziv *et al.*, 1987). Por otra parte, un aumento en la duración e intensidad lumínica en el período *in vitro* causó un incremento de dos veces la densidad estomática en café. Bajo estas condiciones los estomas fueron más funcionales y por lo tanto más preparados para la aclimatización (Ross-Karstens *et al.*, 1998).

En estudios realizados por Zebian y Reekie (1998) en cuatro especies ornamentales en condiciones *ex vitro*, demostraron que cuando las plántulas son expuestas a altas intensidades de luminosidad (400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y concentraciones de CO₂, se observan cambios en la densidad estomática. Resultado similar se observó durante la aclimatización de las plántulas de caña de azúcar, cuando fueron expuestas a mayores intensidades de FFF.

Los efectos del traslado de las plántulas de caña de azúcar a condiciones de aclimatización, con una importante contribución de la mayor intensidad lumínica (1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y la calidad de la luz que aporta la exposición a luz natural, se resumen en que en sólo 14 días (7-21 días), la densidad estomática se incrementó de 22,05 a 103,41 estomas/mm², lo que pudo estimular una mejor actividad de los estomas y con ello, la eficiencia en las relaciones hídricas y la actividad fotosintética.

El comportamiento de las clorofilas desde el momento de salida de las condiciones *in vitro* y durante el tiempo de permanencia de las plántulas en la aclimatización se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Cambios en los contenidos de clorofila a, clorofila b y clorofilas totales ($\mu\text{g g}^{-1}$ mf) en plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización.

Clor.	0	7	14	21	28	35	42 días ^z	EE X
a	62,50 a	55,50 ab	52,02 b	50,80 b	39,00 c	36,25 c	28,10 c	4,80
b	33,50 a	30,00 b	30,60 b	30,60 b	25,00 c	24,15 c	19,15 d	1,40
a+b	96,00 a	85,50 b	81,60 b	81,40 b	64,00 c	50,00 d	4,00 d	6,02
a/b	9,30 a	9,25 a	8,20 b	8,30 b	7,80 bc	7,50 c	7,30 c	0,35

^z Números de días después de la salida *in vitro*. En fila medias con letras diferentes indican significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=10$.

Los contenidos de clorofilas a y b decrecieron ligeramente durante los primeros siete días de incorporadas las plántulas a la fase de aclimatización, aunque sin diferencias significativas para la clorofila a, pero sí en los contenidos de clorofilas b, que se mantuvo constante hasta los 21 días. Cuando las plántulas se transfirieron de las casas de aclimatización a condiciones ambientales naturales (80% HR y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), se observó una mayor y significativa reducción de los contenidos de clorofilas, los cuales se cuantificaron en valores de $39,00\ \mu\text{g g}^{-1}$ mf en el caso de la clorofila a y de $25,00\ \mu\text{g g}^{-1}$ mf para la clorofila b. Estos disminuyeron hasta los 42 días, momento en que se observan diferencias significativas en los contenidos de la clorofila b. La relación clorofila a/b, mostró una paulatina reducción durante la etapa de aclimatización, lo que indica que existe un mayor descenso de las clorofilas a bajo las condiciones de aclimatización experimentadas.

Las variaciones en el indicador clorofilas a/b se han empleado para estudiar los cambios que provoca la luz durante el tránsito de condiciones *in vitro* a *ex vitro* con diferentes respuestas: aumentó en hojas de especies leñosas aclimatizadas en ambientes sombreados ($150\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), mientras que en algunas herbáceas disminuyó, asociado a eficientes respuestas fotoprotectoras (Maxwell *et al.*, 1999; Van Huylenbroeck *et al.*, 2000; Premkumar *et al.*, 2002). En conclusión, la transferencia a ambientes *ex vitro* modifica los mecanismos de absorción de la luz de las hojas, como reflejan las diferencias en la composición de los pigmentos.

El alto contenido de clorofila que se encontró en las hojas de las plántulas en el momento de salida de las condiciones *in vitro* (0 días) y el paulatino decrecimiento durante el proceso, permite conjeturar sobre el proceso de adaptación que éstas experimentaron bajo las condiciones ensayadas.

Esta reducción fue más marcada luego del traslado a condiciones naturales a partir de 21 días, disminución que quizás fue el efecto de la fotooxidación de los pigmentos (Lu y Zhang, 2000). Aún cuando esto ocurre, aumentan los componentes del crecimiento como antes se ha comprobado (Figura 8), lo que puede ser atribuible a la mayor eficiencia de las clorofilas existentes en esos momentos.

Amancio *et al.* (1999) en plántulas de uva encontraron en la aclimatización un gran efecto de los tratamientos de intensidad lumínica ($40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a que se expusieron en las condiciones *in vitro*. En las expuestas a la intensidad de flujo de fotones de $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se cuantifican los menores contenidos de clorofilas a y b, tanto en las hojas formadas en condiciones *in vitro* como las formadas *ex vitro*, aunque en estas últimas se aprecia un ligero incremento, mientras que la intensidad lumínica menor ($40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) duplicó las concentraciones de clorofilas a y b. Este es un efecto muy común en las hojas desarrolladas en condiciones de baja luminosidad, donde la planta invierte mayores asimilatos en el complejo proteína-clorofila del aparato fotosintético para tratar de optimizar el rendimiento a la luz (Levitt, 1980).

Las concentraciones de clorofilas disminuyeron en plántulas de *Hordeum vulgare* a medida que se incrementaron los niveles de intensidad lumínica desde 100 a $1\ 200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con niveles de $16,48 \text{ mg g}^{-1}$ a la intensidad de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y de $6,58 \text{ mg g}^{-1}$ a $1\ 200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Kurasová *et al.*, 2002). Estos autores relacionan las reducciones de las clorofilas en la intensidad de $1\ 200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con la degradación de las proteínas del complejo D_1 y con ello a altos valores de fotoinhibición cuantificados en las mediciones de fluorescencia de las clorofilas a ese FFF.

El contenido de clorofilas en plántulas de cítricos cuando se transfirieron a condiciones de exposición total a la luz, y luego de tres a cuatro semanas de encontrarse bajo estas condiciones se incrementaron nuevamente. Por otra

parte, cuando las mismas se transfirieron desde la exposición total a la luz a 50% de ésta, los contenidos de clorofilas aumentaron significativamente (Syvertsen y Smith, 1984), lo que indica un efecto directo de la intensidad lumínica sobre los contenidos de clorofilas, como los encontrados en caña de azúcar durante el proceso de aclimatización.

El alto porcentaje de daño a las clorofilas y a las hojas también está relacionado con la alta transpiración a que son sometidas las plántulas durante este proceso adaptativo. Se reconoce también que fotosíntesis es sensible a la deshidratación, producto del cierre de los estomas, lo que hace que disminuya el intercambio gaseoso de la planta y la actividad fotosintética.

Al parecer el tiempo en que los contenidos de las clorofilas se estabilizan y luego comienzan su incremento es variable, con alta dependencia de la especie y de las condiciones ambientales. En plántulas de cítricos se alcanzó la estabilización de los pigmentos clorofílicos entre la tercera y cuarta semana en aclimatización (Syvertsen y Smith, 1984). Mientras que en palma de aceite se demostró que la estabilidad se alcanzó aproximadamente a los 90 días (Rival *et al.*, 1998).

En general las plántulas que se desarrollan en condiciones *in vitro* presentan un contenido total de clorofilas que es similar a las cultivadas en condiciones *ex vitro*, siempre que las mismas se desarrollen bajo similares intensidades lumínicas. En proporción con el área foliar, el contenido de clorofila es mayor a bajas que a altas intensidades de luz (Donnelly y Vidaver, 1984; Lee *et al.*, 1985). En todo caso lo importante es que se garanticen las condiciones que permitan la óptima función de estos pigmentos en el metabolismo celular, como base de la productividad de las especies vegetales.

Las plántulas que provienen de las condiciones *in vitro* son muy susceptibles a los cambios ambientales y cuando se someten a una intensidad lumínica alta se produce la fotodegradación de las clorofilas y ello puede limitar el proceso fotosintético (Debergh, 1991; Ziv, 1995; Dejardins *et al.*, 1996; Rival *et al.*, 1998). Efecto que pudo estar presente en las plántulas de caña de azúcar durante las condiciones de aclimatización a que se expusieron las plántulas..

Al evaluar plántulas de *Spathiphyllum* expuestas a intensidades lumínicas de 100 y 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante la aclimatización, se observó que las plántulas expuestas a la mayor intensidad mostraron una significativa reducción de los contenidos totales de clorofilas, desde 42 hasta 35 $\mu\text{g cm}^{-2}$ en los primeros días. Mientras que en las plántulas expuestas a 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no se observó este comportamiento (Van Huylbroeck *et al.*, 1995). Estos autores asocian la reducción en los contenidos de clorofilas al elevar los FFF con la pobre diferenciación de los cloroplastos de las hojas formadas en condiciones *in*

vitro, lo que motivó un mayor grado de estrés y fotoinhibición en las plántulas durante los primeros momentos de la aclimatización.

Se ha planteado que la alta intensidad lumínica puede aumentar la concentración de las plastoquinonas en estado reducido y en ese momento puede aparecer una doble reducción producto de la captación de electrones de la Q_A . Esta reducción puede formar un par $P680^+Feofitina$ que se recombina generando un estado de triplete del P680 que puede reaccionar con oxígeno para dar los radicales libre hidroxilos. Estos radicales libres inactivan las moléculas de clorofilas y por ende la degradación del complejo proteico D_1 del centro de reacción del fotosistema II (Barber, 1994).

La fotoinhibición en un elemento que se vinculan con la calidad de las hojas durante la aclimatización de las plantas, de modo que en necesario que las mismas logren el adecuado control de las relaciones hídricas, el requerido intercambio gaseoso para el metabolismo intermediario y la eficiente actividad de los pigmentos en los centros de fotoreacción; por ello es importante garantizar la sanidad, funcionalidad y permanencia de las hojas en las plantas durante todo el proceso.

Los resultados de este trabajo evidencian el hecho de que aún cuando las concentraciones de los pigmentos clorofílicos disminuyen, las variables de crecimiento (Figura 8) aumentan durante el proceso, lo que ha llevado a conjeturar que la eficiencia de los pigmentos aumenta.

Cuando se analizó la evolución de los órganos foliares de la caña de azúcar durante la fase de aclimatización, mediante el corte transversal de la lámina o limbo de la hoja, se apreciaron los cambios cualitativos experimentados en algunos elementos involucrados con un mejor control hídrico, desarrollo de órganos de reservas, cloroplastos y sobre todo el desarrollo de la anatomía Kranz en algunos importantes momentos durante la aclimatización (Figura 10).

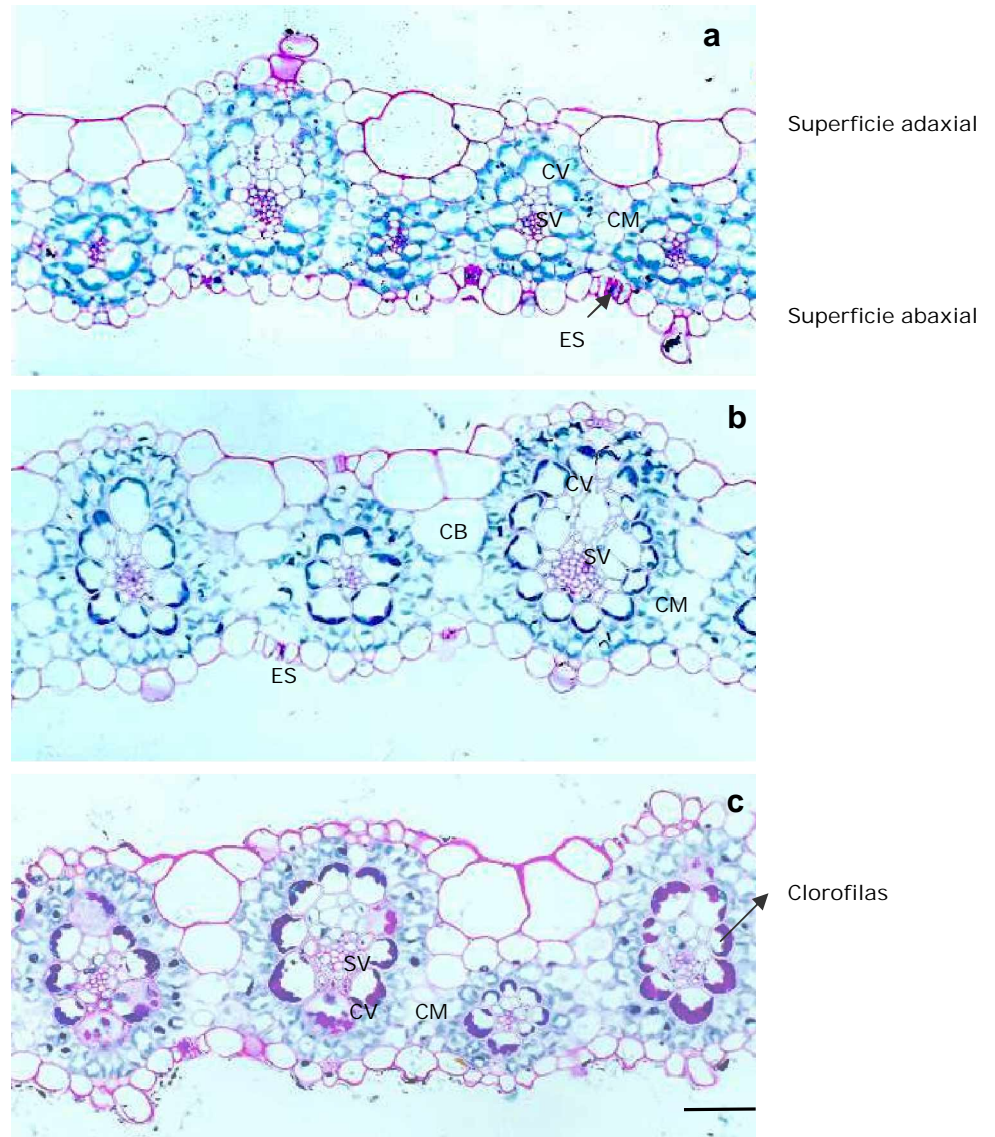


Figura 10. Sección transversal del limbo o lámina de una hoja de caña de azúcar en distintos momentos de su crecimiento durante la aclimatización; momento de salida de las condiciones *in vitro* (a), 21 días en la fase de aclimatización (b) y a los 28 días posterior al traslado de condiciones ambientales. Células de la vaina (CV); células del mesófilo (CM); sistema vascular (SV), células bulliformes (CB); estomas (ES); (20 x)

En el momento de salida de las condiciones *in vitro* se observaron las siguientes características: pobre desarrollo en la proliferación de las células parenquimáticas, mesófilo monoestratificado, escaso desarrollo del estroma, pocos cloroplastos aunque agrupados en forma centrífuga (Figura 10a). En los primeros 21 días se apreció un mayor desarrollo de células bulliformes con

parénquima asociado que atraviesa el mesófilo hasta la epidermis abaxial. Los haces fibrovasculares presentaron mayor desarrollo del estroma, así como las células de la vaina del haz vascular contenían mayor concentración de cloroplastos. Las células de mesófilo se mantenían en un solo estrato (Figura 10b).

A los 28 días en la fase de aclimatización, momento en que las plántulas ya tenían siete días de expuestas a las condiciones ambientales naturales, se apreció una similitud estructural con las hojas adultas en cuanto al desarrollo de las células bulliformes con abundante parénquima anexo, con paredes celulares externas radiales más gruesas, células de las vainas bien definidas, con abundantes cloroplastos adosados a la pared de forma centrífuga. Además, las células del mesófilo fueron biseladas con abundancia de cloroplastos y con presencia de gránulos de almidón (Figura 10c).

El desarrollo de los componentes foliares durante el proceso indica que desde la salida de las condiciones *in vitro* el haz vascular en las plántulas de caña de azúcar se encontraba ya en formación. El adecuado manejo de las condiciones ambientales a que se expusieron las mismas estimuló un mayor desarrollo, las que permitieron una mejor actividad metabólica y con ello el crecimiento experimentado por las plantas.

La planta de caña de azúcar presenta una anatomía foliar tipo Kranz que le permite aumentar en sus hojas varias veces la concentración interna de CO₂ ambiental, de esta manera se logran mayores tasas fotosintéticas y un uso más eficiente del agua. Este mecanismo fotosintético es desarrollado en plantas pertenecientes a ambientes cálidos y con baja disponibilidad de agua en el suelo (Watson *et al.*, 1996).

El grado de desarrollo de la anatomía Kranz observado en las plántula de caña de azúcar desde las condiciones *in vitro*, indica que bajo estas condiciones de cultivo las mismas pueden estar capacitadas para realizar actividad fotosintética, como se ha considerado en otras especies (Kwa *et al.*, 1995; Serret *et al.*, 1997).

En los biorreactores de inmersión temporal el ambiente gaseoso (CO₂, O₂, etileno, HR, ect) en el interior de los frascos de cultivo se renueva en cada

momento de inmersión a que se someten las plántulas, lo que puede motivar un mejor desarrollo de las estructuras foliares y la capacidad para realizar una mayor actividad metabólica.

Los resultados de este experimento demuestran que las estructuras foliares de las plántulas de caña de azúcar durante el proceso de aclimatización se adaptaron paulatinamente a las condiciones ambientales a que se expusieron, las cuales están en correspondencia con los niveles de desarrollo encontrado en las variables fisiológicas que se evaluaron. A su vez, ambas están estrechamente relacionadas con el aumento paulatino del desarrollo autotrófico que deben alcanzar las plántulas durante la aclimatización.

4.6.2. Comportamiento de la sacarosa y las principales enzimas involucradas en el metabolismo del carbono durante el proceso de aclimatización.

Durante el cultivo *in vitro* las hojas de los brotes almacenan carbohidratos que sirven para satisfacer las demandas metabólicas del crecimiento y reposición de los tejidos durante la primera etapa de la aclimatización. Los niveles endógenos de sacarosa en las hojas de caña de azúcar durante la etapa de aclimatización, se muestran en la figura 11.

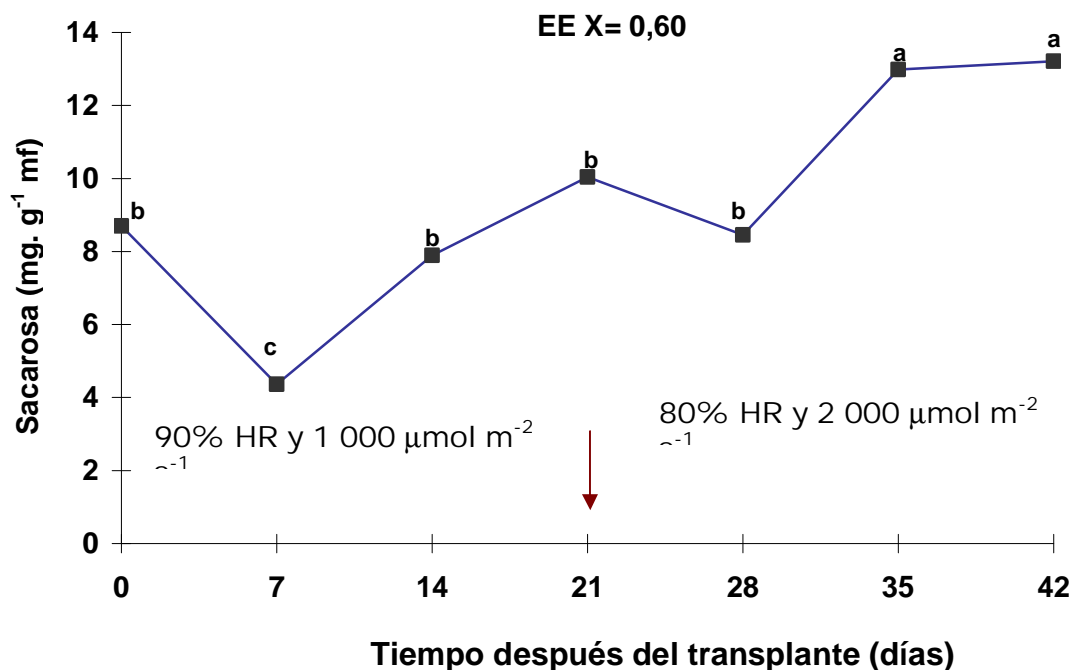


Figura 11. Dinámica del contenido de sacarosa en hojas de caña de azúcar durante la aclimatización. Medias con letras diferentes indican significación (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=9$. La flecha indica el momento del cambio de las condiciones ambientales.

En el momento que se transfirieron las plántulas a condiciones *ex vitro*, luego de permanecer en un medio de cultivo suplementado con 3% de sacarosa, las hojas contenía concentraciones de sacarosa a niveles de $8,70 \text{ mg g}^{-1} \text{ mf}$. En los primeros siete días las concentraciones de sacarosa disminuyeron significativamente hasta $4,36 \text{ mg g}^{-1} \text{ mf}$. Posterior a esta fecha las concentraciones de sacarosa se incrementaron significativamente hasta los 21 días, donde alcanzaron un valor de $10,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ mf}$, luego de este momento (28 días) se pudo apreciar otra ligera pero no significativa reducción en los mismos con respecto a la evaluación que le precedió, reducción que se produce presumiblemente por el nuevo estrés a que se sometieron las mismas al ser expuestas a condiciones ambientales naturales de 80% HR y $2\,000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

En la evaluación que se realizó a los 35 días se pudo apreciar un significativo incremento en los niveles de sacarosa, los que alcanzaron valores de $12,92 \text{ mg g}^{-1} \text{ mf}$, el cual mostró diferencias significativas con las evaluaciones que le precedieron, no así con la evaluación que se realizó a los 42 días.

Se ha observado en hojas de plántulas de caña de azúcar crecidas bajo condiciones de casas de cultivo, que los contenidos de carbohidratos varían cuando se someten a diferentes niveles de estrés hídrico, a medida que el estrés fue más severo la sacarosa disminuyó un 55% con respecto a las plantas control, mientras que las concentraciones de glucosa y fructosa aumentaron desde $3,4$ a $5,0 \text{ mg dm}^{-2}$ y $2,2$ a $3,5 \text{ mg dm}^{-2}$ respectivamente, indicativo de la hidrólisis del disacárido (Du *et al.*, 1998). Aunque este aspecto no se evaluó durante el proceso de aclimatización propuesto, se reconoce que las plántulas se exponen a estrés cada vez que se transfieren de condiciones ambientales, como antes se señaló.

El aumento en las concentraciones de sacarosa está estrechamente relacionado con la cantidad de productos fotosintéticos disponibles (Paul y Pellny, 2003). Aunque la alta acumulación de la misma puede inhibir la

actividad fotosintética. La acumulación de sacarosa permite que mayor cantidad de fotosintetatos se retengan en los cloroplastos y se conviertan posteriormente en almidón (Geingenberger y Stitt, 1991).

Al evaluar los efectos de diferentes condiciones ambientales *in vitro* durante la aclimatización se demostró que las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa en hojas de plántulas de *Rehmannia glutinosa* alcanzaron valores entre 1,0-2,0 mg g⁻¹ mf cuando crecieron en condiciones heterotróficas (Seon *et al.*, (2000). Sin embargo, estas fuentes carbonadas en condiciones autotróficas se comportaron diferente, la glucosa y la fructosa aumentaron alcanzando valores de aproximadamente 9,0 mg g⁻¹ mf, mientras que las concentraciones de sacarosa fueron bajas (0,5 mg g⁻¹ mf). Estos autores plantearon que las fuentes carbonadas en condiciones heterotróficas se consumieron por la actividad respiratoria o se emplearon como suministro de energía hasta que las hojas desarrollaron la capacidad fotosintética.

El comportamiento y los contenidos de sacarosa que se cuantifican en este experimento en las hojas de caña de azúcar durante la aclimatización, mantienen estrecha relación con el desarrollo de las variables morfo-fisiológicas evaluadas.

Las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de la sacarosa constituyen indicadores del comportamiento de esta fuente carbonada. En la figura 12 se muestra la actividad enzimática de la sacarosa sintasa, sacarosa fosfato sintasa e invertasas ácidas y neutras durante el proceso de aclimatización.

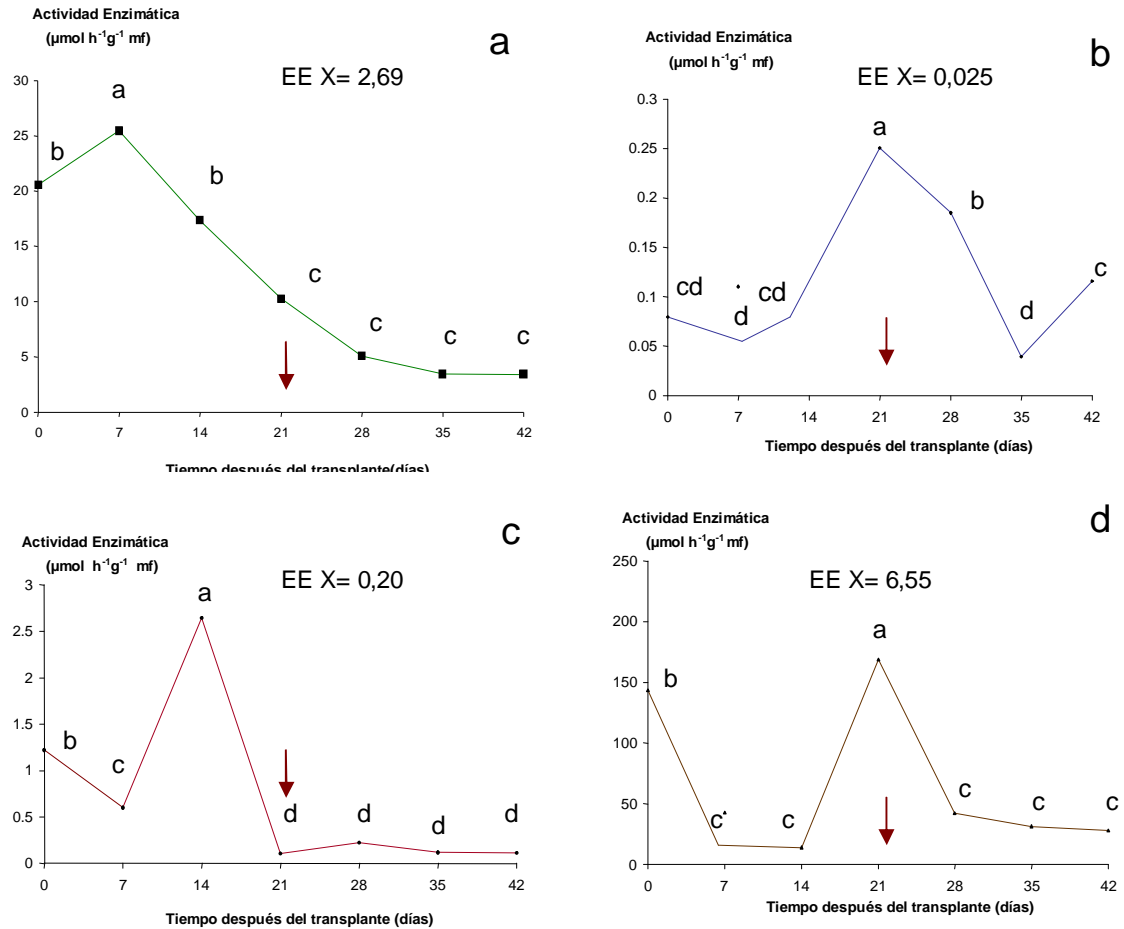


Figura 12. Actividad enzimática de la sacarosa sintasa (SS) (a), sacarosa fosfato sintasa (SPS) (b), invertasas ácidas y neutras (IA, IN) (c, d), durante el proceso de aclimatación. Medias con letras diferentes indican significación (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=9$. La flecha indica el momento de cambio de las condiciones ambientales.

La actividad enzimática de la sacarosa sintasa (SS) mostró un aumento significativo que alcanzó valores de $26,3 \mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{mf}$ en los primeros siete días de expuestas las plántulas a las condiciones de aclimatación, seguido de un descenso continuo a través de todo el proceso (Figura 12a).

En el análisis de la actividad de la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), la mayor actividad se alcanzó a los 21 días de permanecer las plántulas en la fase de aclimatación, con valores de $0,27 \mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{mf}$ (Figura 12b). La actividad de esta enzima disminuyó significativamente a partir de los 21 días, lo cual está relacionado con el nuevo cambio de condiciones ambientales a que se sometieron. Ya a partir de los 35 días se observó un aumento de la misma,

tal vez motivado por la adaptación del aparato fotosintético de las plántulas de caña de azúcar a las nuevas condiciones de aclimatización.

A los 14 y 21 días se alcanzaron los valores más altos (2,7 y 165 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ mf) de actividad de las invertasas ácidas y neutras respectivamente (Figura 12c y 12d), mostrando diferencias significativas con los demás momentos. Posterior a la mayor actividad enzimática de las invertasas (IA e IN) una significativa reducción se pudo cuantificar para ambas enzimas.

En la evaluación realizada a los 28 días se observó una significativa disminución como consecuencia del cambio de condiciones ambientales a que fueron sometidas las plántulas. Indicadores morfológicos como el número de hojas y raíces, el contenido de clorofilas a y b, así como la actividad enzimática de la SPS y de las invertasas neutras también se afectaron, lo que indica que las plántulas se exponen a condiciones ambientales que las hace disminuir su actividad metabólica temporalmente.

Las plántulas provenientes de cultivo *in vitro*, durante los primeros momentos de la aclimatización utilizan las sustancias que han podido almacenar en sus órganos bajo estas condiciones de crecimiento. Este hecho está en correspondencia con la alta actividad que presentó la enzima SS en los primeros siete días en aclimatización. La cual actúa en la transformación de sacarosa a glucosa y fructosa. Esta enzima deja de ser importante cuando las hojas comienzan a adquirir función autotrófica. Es probable que el grado de heterotrofismo desarrollado por las plantas *in vitro*, por la presencia de sacarosa exógena en el medio de cultivo, sea la causa por la cual la actividad de la SS se incrementa en los primeros momentos de su traslado a las condiciones *ex vitro* (Nguyen-Quoc *et al.*, 1990; De Rieck, *et al.*, 1991; Van Huylenbroek *et al.*, 1995; Grof y Campbell, 2001). Esta alta actividad también se puede relacionar con la significativa reducción encontrada en los contenidos de sacarosa (Figura 11), la cual presumiblemente es causada por su hidrólisis por la enzima SS.

Como se aprecia en la figura la actividad de la enzima SS en condiciones *in vitro* fue alta, lo que indica su acción en la internalización de sacarosa en vacuola. Posterior al cambio de ambiente, la planta necesita movilizar esa

fuentes carbonadas almacenadas para poder suministrarla a otros órganos en las formas más asimilables (glucosa y fructosa). También el cambio de ambiente pudo provocar algún grado de estrés, el cual hace que incremente la respiración y por ello la planta necesita de energía que son obtenidas de la degradación de la sacarosa almacenada, lo que hace que la actividad de la SPS incremente aún más su rol catabólico en los primeros siete días de aclimatización.

El desarrollo que lograron las hojas a partir de los 14 días coincide con la alta actividad de la enzima SPS. Posiblemente la formación de nuevas hojas y su desarrollo conllevaron al funcionamiento del aparato fotosintético, el cual les permitió elaborar por sí solas los fotosintetatos necesarios. Este hecho convierte a las hojas en productoras y exportadoras de fuentes carbonadas como normalmente ocurre en las condiciones de campo. Resultados similares fueron encontrados por Nguyen-Quoc *et al.* (1990) los que determinaron que el incremento en la actividad de la SPS en las hojas de maíz fue mayor a medida que se alcanzaban cambios fotoautotróficos, este incremento se relacionó con la actividad fotosintética que lograron las plantas.

La enzima SPS es una enzima del anabolismo de las plantas, la misma se encarga de sintetizar la sacarosa a partir de glucosa y fructosa en los momentos que la planta logra el autotrofismo. Como se aprecia la actividad de la enzima fue mayor a los 21 días, luego que las plántulas emitieran los nuevos y autotróficos órganos (hojas y raíces). Este incremento indica que las hojas se convierten en órganos productores de fotosintetatos.

La mayor actividad de la SPS que se encontró en las hojas de caña de azúcar durante la aclimatización, guarda estrecha relación con los niveles de sacarosa que se obtienen a partir de los 14 días. Esto puede estar relacionado con el grado de autotrofismo alcanzado por las plántulas durante todo el proceso. Sin embargo, en el traslado a condiciones de ambiente natural se pudo observar una significativa reducción de la misma, quizás motivada por el incremento de la temperatura, mayor grado de estrés ambiental y el incremento de la intensidad lumínica.

Se ha observado que la actividad de la SPS en las hojas de plántula de *Triticum aestivum* se activó cuando se expusieron a la luz, este cambio

incrementó la afinidad por el sustrato y el activador (glucosa-6-fosfato). Una momentánea reducción del estado de activación de la SPS se observó al medio día, producido como respuesta de la enzima a los cambios en la tasa de fotosíntesis en ese momento, el cual pudo afectar el suministro del sustrato de la enzima (Trevanion *et al.*, 2004). También se ha demostrado que la actividad de la SPS es altamente regulada por la planta, la misma es activada por la luz y condiciones de estrés osmóticos (Lunn y Macrae, 2003).

Al parecer los niveles de estrés ambiental (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995; Hronková *et al.*, 2003; Talbott *et al.*, 2003; González-Olmedo *et al.*, 2005) a que se exponen las plántulas de caña de azúcar en las condiciones experimentales ensayadas afectaron temporalmente la concentración de sacarosa y la actividad de la SPS en las hojas. No obstante a que los cambios de ambientes ensayados en el experimento fueron satisfactorios para una mejor adaptación de las plántulas, pudieron también afectar temporalmente algunos procesos metabólicos. También Du *et al.* (1998) observaron una reducción de la actividad de la SPS en función del incremento del estrés hídrico a que se sometieron las plantas de caña de azúcar.

Se ha señalado que la actividad de las enzimas invertasas está asociada con la degradación de la sacarosa, fundamentalmente en los órganos de almacenaje (Kingston-Smith *et al.*, 1999). Aunque las hojas, como órganos fotosintéticos fundamentales, no necesitan de estas enzimas al ser capaces de abastecerse de fuentes carbonadas por sí solas, durante los primeros días de la aclimatización de las plántulas se requiere de la movilización de este disacárido presente como reserva en las mismas. Este hecho puede justificar la alta actividad de estas enzimas en las hojas de las plántulas de caña de azúcar, en los primeros días de la fase de aclimatización. Van Huylenbroeck *et al.* (1998) refirieron resultados similares para las invertasas ácidas en plántulas de *Spathiphyllum*. A la misma vez, este comportamiento apoya el hecho de que las plantas de caña de azúcar en la medida que son más autotróficas no requieren del desdoblamiento de la sacarosa como fuente de carbono.

En el caso del comportamiento de las invertasas, resultó evidente que su papel de hidrólisis de la sacarosa en las hojas fue secundario con respecto a la SS. Esta última fue la más activa en los primeros siete días, en correspondencia

además con los inferiores valores de K_m que se le conocen con respecto a ambas invertasas (Moore y Maretzki, 1999).

En el mismo orden de interpretación de la actividad enzimática en función de la afinidad, a los 14 días las IN igualan el protagonismo de la SS en el desdoblamiento de la sacarosa, en ambas se registraron valores próximos a las 15 unidades. Sin embargo este es el momento de máxima actividad de las invertasas ácidas pero sólo con 2,7 unidades.

Finalmente a los 21 días sólo son significativos los efectos catabólicos de las invertasas neutras que lograron su máxima actividad durante el proceso. La interpretación de éste comportamiento puede relacionarse con varios antecedentes entre ellos: las invertasas neutras son más abundantes en el extracto por estar localizadas en el citosol, mientras las ácidas están enlazadas a estructuras de pared y vacuolas; la K_m de las IN es inferior a las de las IA; y las neutras incrementan su actividad en las hojas maduras (Kingston-Smith *et al.*, 1999; Moore y Maretzky, 1999), en correspondencia con los resultados de la figura 8. Posterior a esta fecha, como ocurrió a los 21 días para las IA, se manifestó una reducción de la actividad de las IN por agotamiento del sustrato en las cantidades requeridas para la catálisis.

Como antes se valoró el comportamiento de las enzimas involucradas en el metabolismo de la sacarosa no se ha estudiado en hojas de caña de azúcar con la profundidad con que se han realizado en el tallo (Grof y Campbell, 2001). De modo que los resultados e interpretaciones de este experimento constituyen modestos aportes al conocimiento de las vías metabólicas que participan en el proceso de aclimatización de la caña de la azúcar.

Los resultados hasta ahora muestran que, en los primeros 14 días las plántulas de caña de azúcar utilizan las reservas que obtienen durante el cultivo *in vitro*, que les permiten enfrentar las condiciones de estrés a las que están expuestas en el ambiente *ex vitro* (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995; Hronková *et al.*, 2003; Talbott *et al.*, 2003; Tallman, 2004; González-Olmedo *et al.*, 2005). Durante esta etapa las enzimas relacionadas con la degradación de la sacarosa presentaron su máxima actividad. Ya a partir de los 14 días las plantas comienzan a emitir nuevas hojas y órganos

funcionales que las hacen más autotróficas. La actividad de la SPS indica que las hojas se convierten en órganos productores de fotosintetatos.

Las plántulas de caña de azúcar son susceptibles a los cambios ambientales durante la aclimatización, aunque se observó una rápida recuperación. Durante el desarrollo autotrófico, éstas experimentaron cambios sustanciales en el proceso de aclimatización, sobre todo en los primeros 21 días. Los cambios estuvieron asociados a los contenidos de clorofilas, la emisión de nuevas hojas, así como el desarrollo de la anatomía Kranz y la actividad de la SPS.

Es pertinente relacionar el conocimiento de las transformaciones y los cambios que experimentan las plántulas durante el procedimiento de aclimatización propuesto, con el desarrollo de la actividad fotosintética. Así se podrá conocer si las mismas han logrado el necesario e importante tránsito del fotomixotrofismo a fotoautotrofismo.

4.7. Comportamiento de la actividad fotosintética de las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización.

4.7.1. Evaluación del comportamiento de la actividad fotosintética y la transpiración de las plántulas durante la aclimatización.

En la figura 13 se muestra el comportamiento de la fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y de la transpiración ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante la aclimatización.

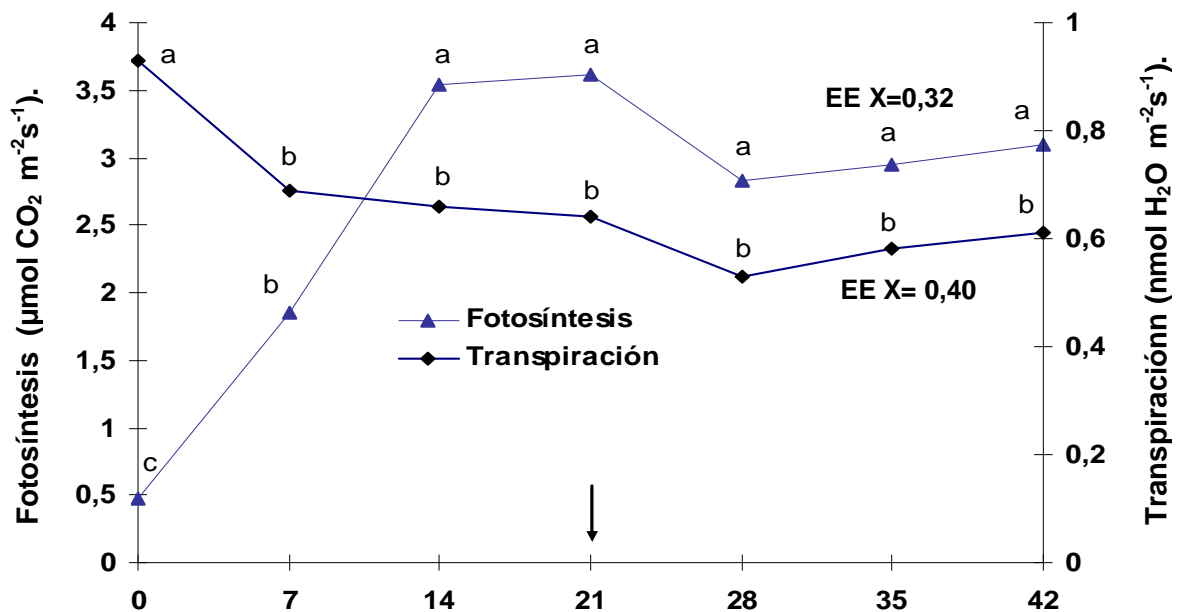


Figura 13. Actividad fotosintética y transpiratoria en plántulas de caña de azúcar durante el proceso de aclimatización. Medias con letras

diferentes indican significación (Kruskall-Wallis, Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=9$. La flecha indica el momento del cambio de las condiciones ambientales.

La actividad fotosintética de las plántulas en el momento de salida de las condiciones *in vitro* (BIT) es muy baja, con valores de $0,47 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Luego de permanecer siete días bajo las condiciones *ex vitro*. Los valores resultaron significativamente mayores ($1,85 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). El incremento de la actividad fotosintética continuó hasta los 14 días con valores de $3,54 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, lo que coincide con la formación y desarrollo del nuevo follaje (Figura 8).

Cuando las plántulas fueron transferidas desde las condiciones ambientales controladas y expuestas a mayores FFF con 80% HR, se apreció una leve y transitoria reducción en la actividad fotosintética ($2,83 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Bajo estas condiciones, la fotosíntesis tiende a incrementos no significativos de sus valores absolutos como consecuencia de la adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

Las plantas C_4 han evolucionado en el tiempo y han adaptado su anatomía y metabolismo para crecer y desarrollarse bajo condiciones de estrés salino, alta temperatura, etc. No obstante a esta positiva evolución, la mayor actividad fotosintética en caña de azúcar bajo condiciones de aclimatización se ha logrado a FFF a aproximadamente $700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A partir de esta intensidad, el incremento de los FFF debe estar acompañado de condiciones idóneas de crecimiento (humedad, temperatura, sanidad y nutrición). Si el aumento en los FFF es muy alto y no se logran estas condiciones se puede afectar en las plántulas la actividad fotosintética.

También se ha observado que la fotosíntesis en plántulas de caña de azúcar crecidas en casa de cultivo es muy sensible a los niveles de humedad, a la conductancia estomática, los contenidos de clorofilas y la actividad de las enzimas (Du *et al.*, 1998). En el caso de este trabajo, luego del cambio de ambiente disminuyeron los contenidos de clorofilas, también se apreció una reducción de la transpiración lo que pudo provocar el cierre de los estomas razones que pudieron limitar que la fotosíntesis no se haya incrementado luego del aumento de los FFF.

El aumento de la fotosíntesis desde el momento de salida de las condiciones *in vitro* es un indicador de que las plántulas de caña de azúcar mejoran la calidad por las condiciones de cultivo que imponen los BIT. Por ello las mismas pueden adaptarse fácilmente a las nuevas condiciones ambientales a que son transferidas desde los primeros momentos de la aclimatización.

Se ha demostrado que los BIT presentan ventajas sobre los métodos de micropropagación convencional en términos de eficiencia. También ha sido demostrado su positivo efecto en cuanto a la aireación del medio de cultivo líquido y el ambiente (Ziv, 1995, Martre *et al.*, 2001, Chen y Ziv, 2003). El mismo propicia un mejor contacto entre la planta y el medio de cultivo y no provoca restricciones en el intercambio gaseoso, lo que incrementa las condiciones fotomixotróficas.

En el caso de la caña de azúcar propagada en BIT, el mejor contacto entre el medio de cultivo y la planta puede promover mayor desarrollo de las plántulas

en los BIT. Producto de un incremento en la asimilación de carbohidratos, nutrientes y reguladores del crecimiento. Lo que trae consigo una mayor acumulación en los órganos de reserva de la planta, los que pueden ser empleados en los días posteriores del tránsito a condiciones *ex vitro* y con ello el incremento de la supervivencia y más rápido cambio del heterotrofismo a autotrofismo.

Se ha demostrado que la alta acumulación de biomasa de las plántulas durante el crecimiento *in vitro* incrementa la eficiencia durante la aclimatización (Fila *et al.* 1998). Efecto que también pudo estar relacionado con el mayor desarrollo autotrófico que pudieron alcanzar las plántulas de caña de azúcar propagadas en BIT.

Durante el cultivo *in vitro*, se han observado bajas tasas fotosintéticas en diferentes especies (Grout y Donkin, 1987; Desjardins *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2001; Van Huylenbroeck y Debergh 1992; Desjardins, 1995 b; Hdider y Desjardins 1995; Ticha *et al.*, 1999). La mayoría de estos investigadores consideran que las plantas *in vitro* requieren suministros exógenos de sacarosa como fuente carbonada y de energía para el crecimiento y desarrollo de los explantes. A pesar que ésta restringe la fotosíntesis de las plántulas, mejora la supervivencia y el crecimiento durante la aclimatización (Vorackova *et al.* 1998; Serret *et al.* 2001). Sin embargo, resultados recientes muestran que éstas logran un metabolismo fotoautotrófico sí se facilitan adecuadas condiciones ambientales y de cultivo durante el desarrollo *in vitro*, como son la reducción de la concentración de sacarosa e incrementos de CO₂ y FFF (Ziv, 1995; Kozai y Zobayed, 2000; Seon *et al.*, 2000; Serret *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2003).

Los resultados en éste trabajo demuestran que las hojas de caña de azúcar que se forman *in vitro* muestran actividad fotosintética, ya que se puede apreciar valores de 0,47 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y que posterior al traslado a condiciones de aclimatización la actividad de las mismas se incrementa. No obstante, los valores de fotosíntesis que alcanzan las plántulas durante la aclimatización son bajos, si se comparan con los obtenidos por Meinzer y Zhu (1998) los que lograron 8,32 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en casa de cultivo en condiciones de crecimiento idóneas. También Lu y Zhang (2000) encontraron en plántulas de maíz crecidas en macetas en condiciones de ambiente natural y con intensidad lumínica de 1 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, que la actividad fotosintética máxima fue de 8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

En plantas de *Rehmanni glutinosa* bajo tratamientos autotróficos y heterotróficos *in vitro* observaron diferencias en la aclimatización (Jeong-Hoo *et al.*, 2000). Estas diferencias fueron mayores en los primeros momentos de la aclimatización; luego y

durante su permanencia en esta fase las mismas desaparecieron. Lo que indica que en éste cultivo, los tratamientos de autotrofismo a que se exponen las plántulas ejercen un efecto positivo sólo en los primeros días de aclimatización y por ello es factible su empleo para reducir la mortalidad de las plantas en estos críticos momentos.

Los bajos niveles de fotosíntesis que también se observaron en la evaluación que se realizó a los siete días de aclimatización, están motivados por el efecto que han ejercido las condiciones de cultivo *in vitro* en las plántulas, la adaptación a las nuevas condiciones ambientales a que se exponen y el poco desarrollo de los órganos foliares, que aún en esos momentos no son autótrofos.

A los 14 días se observó un incremento en los niveles de la actividad fotosintética, que hacen que se manifiesten diferencias significativas con respecto a los momentos que le preceden. Sólo se observó una ligera disminución posterior al cambio de ambiente que se realizó a los 21 días, lo que es característico cuando existen cambios bruscos de ambiente. Estos niveles se mantienen constantes hasta el final del experimento, lo que indica la adaptación de las plántulas a los ambientes externos.

También Van Huylbroeck *et al.* (1995) observaron que en plántulas de *Spathyphyllum* propagadas convencionalmente y expuestas a $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ existió una respuesta de la actividad fotosintética, las que lograron valores de $1,15 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ inmediatamente que se transfirieron a condiciones *ex vitro*. Este valor se incrementó a $1,23 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en sólo 10 días. A medida que el tiempo transcurrió bajo estas condiciones, la fotosíntesis alcanzó valores de $1,32 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Sin embargo, las plántulas de *Calathea* expuestas a $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ al transferirse a exteriores, no presentaron actividad fotosintética alguna en los primeros tres días de aclimatización. Luego de los 10 días de permanencia en esta fase se apreciaron incrementos de $1,56 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$; ya a los 30 días los valores alcanzan niveles de $3,74 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, lo que denota un cambio metabólico de heterotrofismo a autotrofismo y la formación de un aparato fotosintético funcional (Van Huylbroeck *et al.*, 1995).

Como es típico en las especies C_4 , la caña de azúcar se recuperó rápidamente de las condiciones ambientales estresantes a que se expusieron durante la aclimatización. La baja actividad fotosintética observada puede estar asociada a la fijación de CO_2 por la PEPC y los mecanismos de la concentración de CO_2 en estas especies. Es conocido que bajo condiciones estresantes la eficiencia de la Rubisco se afecta, cuando estas condiciones desaparecen los niveles de actividad enzimática alcanzan los valores normales (Crafts-Brandner y Salvucci, 2002).

En caña de azúcar en la evaluación realizada a los siete días se apreció el incremento de la actividad fotosintética, aunque se observó también una reducción de la transpiración. En plantas de ají se observó que luego de un decrecimiento significativo de la actividad fotosintética posterior a la exposición a condiciones de aclimatización, en sólo dos días, las mismas comenzaron a incrementar. También mejoró la regulación hídrica y se incrementó la conductancia estomática. Estos incrementos fueron constantes a partir del sexto día (Estrada-Luna *et al.* 2001).

Evaluando el comportamiento fotosintético de plantas de espárrago (*Asparagus officinalis*) en condiciones *in vitro* y durante la aclimatización, y luego comparandolas con las provenientes de semillas Yue *et al.*, (1992) observaron que las plántulas en aclimatización alcanzan el punto de saturación de luz a $450 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y muy bajos niveles de fotosíntesis fueron observados ($0,38 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Estos autores concluyen que las mismas en condiciones *in vitro* tienen actividad fotosintética. Pero la baja actividad mostrada durante la aclimatización la asocian con el cierre de los estomas. Lo cual también pudo estar relacionado con la reducción de la transpiración observada durante la aclimatización de las plántulas de caña de azúcar y los bajos niveles de fotosíntesis registrados (Figura 13).

Es obvio que la calidad estructural y funcional que lograron las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización posibilitó una actividad metabólica superior, en particular por la recuperación de la actividad fotosintética garantizada por la emisión de órganos autotróficos. Estos factores juntos al desarrollo estomático, el incremento del superficie foliar y del número de raíces, hicieron que el crecimiento de la plántulas fuera constante bajo las condiciones de aclimatización propuesta.

Los niveles de transpiración en las plántulas de caña de azúcar variaron según las condiciones ambientales a que se expusieron. Se observó una alta y significativa transpiración en las hojas formadas *in vitro* ($0,93 \text{ nmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en el momento de salida de estas condiciones. A los siete días posteriores al transplante se alcanzaron valores de $0,69 \text{ nmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, los cuales muestran diferencias significativas con la evaluación que le precedió. Luego de esta fecha la transpiración fue estable, lo que al parecer demuestra que en sólo siete días los estomas comienzan a controlar la pérdida de agua.

Estos resultados están en correspondencia con el hecho de que durante la aclimatización, la transpiración se redujo gradualmente a partir de que los estomas comienzan a realizar sus funciones, por lo que disminuye la pérdida de agua desde la cutícula (Wardle *et al.*, 1979; Pospisilova *et al.*, 1997; Fila *et al.*, 1998). No obstante, en algunas especies la tasa de transpiración estomatal y cuticular en hojas *in vitro* son muy altas y causan dificultad posterior al transplante a las condiciones *ex vitro* (Pospisilova *et al.*, 1992).

Se ha demostrado que la transpiración cuticular es un proceso que ocurre extremadamente rápido y que sólo basta un pequeño período de tiempo de exposición a condiciones de estrés para que el daño sea irreversible. Más del 95% de las pérdidas de agua que ocurren en las plántulas, sólo en la primera hora de su salida a exteriores, es mediante la vía cuticular; esta rápida pérdida provoca un desbalance hídrico que acelera la muerte de las mismas durante la aclimatización (Marín *et al.*, 1988).

La emisión de órganos más funcionales en condiciones *ex vitro* y los adecuados cambios ambientales a que se sometieron las plántulas en este experimento, estimularon el ligero incremento de la actividad fotosintética y no se observó marcadas pérdidas de agua por transpiración. Lo que indica que el tratamiento ambiental es adecuado para el desarrollo de la misma y por ello se producen incrementos en los indicadores del crecimiento (Figura 8).

Conocer la actividad fotosintética de las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización, pero bajo condiciones ambientales estáticas y estrictamente reguladas, es también de suma importancia para saber la magnitud del efecto de los ambientes estresantes a que se exponen, resultados que se muestran en el acápite que se expone a continuación.

4.7.2. Efecto de diferentes condiciones ambientales estáticas sobre variables del crecimiento y la actividad fotosintética de las plántulas.

En la tabla 9 se puede observar el efecto de la luz y la humedad relativa sobre variables del crecimiento y la actividad fotosintética de las plántulas de caña de azúcar luego de permanecer 28 días bajo condiciones ambientales invariables.

Tabla 9. Influencia de la luz y la humedad relativa sobre la emisión de hijos, masa fresca de la planta (g) y su correspondiente follaje a los 28 días en cámara de aclimatización.

FFF ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	H. R. (%)	Hijos/planta	MF/Planta (g)	MF/Follaje (g)	Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
200	35	2,33 bc	1,01ab	0,38 b	0,69 c
200	75	1,90 c	1,39 a	0,76 a	1,31 c
800	35	3,80 b	0,23 c	0,15 c	2,33 b
800	75	6,08 a	0,66 b	0,37 b	4,50 a
EE X		0,81	0,18	0,11	0,25

En columna medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p < 0,05$). Cada dato representa la media para $n=20$.

En el análisis se pudo observar que existían diferencias significativas en las interacciones de los tratamientos en cada una de las variables experimentales evaluadas. En el caso de la interacción de $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 75% de HR se alcanzó los mayores niveles en las variables número de hijos por planta y fotosíntesis neta. Mientras que la interacción de $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 75% de HR lo logran en las variables masa fresca del follaje y masa fresca de la planta.

Los altos niveles de intensidad lumínica y humedad relativa tuvieron un marcado efecto en el número de hijos, con diferencias significativas con los demás tratamientos experimentales. Por otra parte las masas frescas, tanto de

la planta como del follaje alcanzaron los mayores valores en los tratamientos de menor intensidad lumínica, con 1,39 y 0,76 g respectivamente.

Al evaluar estas variables ambientales sobre el efecto que ejercen en la actividad fotosintética de las plántulas, se pudo comprobar que también inciden directamente en ella. Las plántulas que crecieron a alta intensidad lumínica, fueron las que mayor fotosíntesis presentaron, aunque con diferencias significativas entre ellas, motivado por las condiciones de humedad relativa en que permanecieron durante el experimento.

El rendimiento fotosintético en las plántulas que se adaptaron a altos niveles de luminosidad fue mayor que en aquellas adaptadas a bajo niveles. Así lo demuestran los resultados que se alcanzaron en este experimento, donde se apreció diferencias significativas entre las plántulas sometidas a los dos niveles de luminosidad, lo que indica la respuesta de la caña de azúcar a los incrementos de intensidad lumínica durante la aclimatización.

La exposición prolongada de hojas de *Calathea* que se formaron *ex vitro*, bajo condiciones de alto flujo de fotones fotosintéticos, disminuyó la actividad fotosintética (Van Huylbroeck *et al.*, 1998). Estos autores observaron también una reducción de los contenidos de clorofilas producto del daño que se produjo en el fotosistema II por las altas intensidades a que fueron sometidas las plántulas, aparentemente evitado en el caso de caña de azúcar.

En la caña de azúcar la alta intensidad lumínica que se evaluó, estimuló la actividad fotosintética motivada quizás por el metabolismo C₄ que presenta esta especie, lo que se atribuye a un mejor funcionamiento en la fijación del CO₂ atmosférico, por mayor actividad fotosintética y alta productividad (Murata, 1981; Hatch, 2002). Las plántulas sometidas al tratamiento de menores FFF y HR, presumiblemente cerraron los estomas, de acuerdo a los valores de transpiración, y con ello se redujo la fijación del CO₂, lo que motivó los bajos niveles de fotosíntesis registrados.

Las plantas que crecen bajo condiciones de poca luminosidad, tienen que adaptarse rápidamente cuando se transfieren a condiciones de aclimatización, muchas de ellas mueren en momentos tempranos por un mal manejo de las condiciones ambientales a que se exponen (Van Huylbroeck *et al.*, 1995). Es

por ello la importancia de crecer las plantas en ambiente completamente controlado, lo que puede servir como patrón para comparar los resultados con plantas crecidas en otras condiciones ambientales.

Los resultados que se lograron en este experimento indican la necesidad de incrementos en la intensidad de la luz para lograr una mayor actividad fotosintética en las plántulas de caña de azúcar durante la fase de aclimatización. Por ello, el aumento progresivo de la intensidad lumínica a que se expusieron las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización ($1\ 000$ y $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), no parece ser el factor que más afectó los bajos valores de fotosíntesis que se evaluaron. Tampoco el manejo ambiental que se realizó durante esta etapa fue la causa fundamental de la baja actividad fotosintética cuantificada, dado por los más altos valores de fotosíntesis registrados en ambos experimentos ($3,10\ \mu\text{mol CO}_2\ \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a los 42 días y $4,50\ \mu\text{mol CO}_2\ \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a los 28 días).

La mayor fotosíntesis medida en las plántulas que crecieron en las cámaras con condiciones estrictamente controladas, a pesar de tener menor tiempo en aclimatización (28 días) y menor FFF ($800\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), se debió a que durante las 16 h del fotoperíodo la intensidad de la luz fue constante. También fue invariable la HR y sus efectos sobre la transpiración y la conductancia estomática. Como resultante se presume mayor duración de la excitación de los fotosistemas pigmentarios, capaces de producir los equivalentes de reducción y la energía necesaria para la fijación fotosintética de CO_2 asimilado.

Las plántulas que se aclimatizaron en las casas de cultivo, estuvieron bajo condiciones ambientales variables. En ellas, como en plantas de caña de azúcar que crecieron en campo ($1\ 600\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de FFF), bajo condiciones de humedad y nutrición, la mayor actividad fotosintética se registró en horas del medio día, de 12:00 m a 2:00 pm (Du *et al.*, 1998). La fotosíntesis de estas últimas alcanzó registros de $38\ \mu\text{mol CO}_2\ \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, varias veces superiores a los máximos medidos en ambos experimentos de aclimatización de este trabajo.

En resumen, las plántulas de caña de azúcar propagadas mediante biorreactores de inmersión temporal tienen baja actividad fotosintética. Aún así, los datos confirman cómo la supervivencia de las mismas durante la primera semana en la aclimatización depende de las sustancias de reserva acumuladas *in vitro*. Desde los 14 días son más fotoautotróficas, debido a la nueva formación de hojas y raíces, así como la fotosíntesis medida en esa fecha. Con dependencia de las condiciones ambientales a que se sometieron las plántulas se manifestó la fotosíntesis. De esta forma se demostró que la eficiencia fotosintética en caña de azúcar se incrementa para influir determinadamente en las variables de crecimiento.

El aumento de los niveles de fotosíntesis estuvo en correspondencia con el ascendente crecimiento de las plántulas. Algunos indicadores morfológicos y enzimáticos demuestran este planteamiento y justifican el aumento de los niveles de fotosíntesis, ellos son: la emisión y desarrollo de nuevos órganos y el aumento de la actividad de la enzima SPS.

Como se ha valorado con anterioridad, el comportamiento de las plántulas en la fase de aclimatización está determinado por los sistemas de cultivo *in vitro*, que generan patrones de multiplicación cuyos coeficientes rinden altas proporciones de plántulas competentes. También determinan los manejos de

las condiciones ambientales antes, durante y posterior a su traslado a exteriores, así como otras labores que logren los mayores porcentajes de supervivencia y tasas de crecimiento y posterior desarrollo de las plántulas.

Los resultados de este trabajo demuestran que el procedimiento de aclimatización que se empleó, estimuló las variables morfo-fisiológicas y bioquímicas evaluadas. El mismo permitió altos porcentaje de supervivencia y el crecimiento de las plántulas, lo que conllevó a la reducción del tiempo aclimatización.

5.0 CONCLUSIONES

- 1- Las plántulas con masa fresca superior a 0,31 g en el momento de salida de los BIT, junto con la combinación de cachaza + ceniza (1:1, v:v), logran niveles de supervivencia superiores al 96% bajo las condiciones de aclimatización propuesta.
- 2- La combinación de ambientes de 90% HR y FFF de $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante los primeros 21 días y luego 80% HR y FFF de $2\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ otros 21 días, estimuló el número de raíces, el área foliar y la densidad estomática, elementos que integrados justifican los aumentos de las masas fresca y seca.
- 3- Los niveles de clorofilas se redujeron durante la aclimatización y no guardaron relación con la actividad fotosintética, las estructuras foliares y los incrementos de las variables de crecimiento.
- 4- Las concentraciones de sacarosa se afectan con los cambios ambientales. La actividad de las enzimas SPS y la SS se corresponden con la acumulación de esta biomolécula.
- 5- La fotosíntesis en las plántulas aumentó durante la aclimatización, lo que justifica el crecimiento fotoautotrófico.
- 6- La integración de los factores calidad de las plántulas cultivadas *in vitro*, tipo de sustrato, condiciones ambientales (HR y FFF), permitieron elevados niveles de supervivencia y garantizó plántulas con la calidad requerida para ser transferidas directamente al campo en sólo 42 días.

6.0 RECOMENDACIONES

- 1- Continuar con la aplicación de estos resultados en la aclimatización de plántulas de caña de azúcar provenientes de Biorreactores de Inmersión Temporal en otros laboratorios comerciales que propaguen esta especie.
- 2- Realizar estudios similares en la fase *in vitro* a partir de modificaciones del ambiente en los Biorreactores de Inmersión Temporal para garantizar plantas con mayor calidad para la aclimatización.

ABREVIATURAS

ABA	: Acido abscísico.
AIA	: Acido 3-indolacético.
AIB	: Acido indolbutírico.
ANA	: Acido naftalenacético.
BA	: Benciladenina
BIT	: Biorreactores de Inmersión Temporal.
CAM	: Metabolismo Acido de las Crasuláceas.
EE	: Error Estándar
FFF	: Flujo de fotones fotosintéticos.
GA₃	: Acido giberélico.
HR	: Humedad Relativa.
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución.
IN	: Invertasa Neutra.
IA	: Invertasa Acida.
MF	: Masa fresca.
MS	: Murashige y Skoog.
NM	: Norma Ramal de la Agricultura.
RUBISCO	: Ribulosa bi fosfato carboxilasa/oxigenasa.
PBZ	: Paclobutrazol.
PEPC	: Fosfoenol Piruvato Carboxilasa.
SS	: Sacarosa Sintasa.
SPS	: Sacarosa Fosfato Sintasa.

7.0 BIBLIOGRAFIA.

ACOSTA, M.; L. HERRERA; Y. ALVARADO; M. A. DITA. 1995. Uso de bioestimulantes en la fase de adaptación de vitroplantas de papa, banano y caña de azúcar. Centro Agrícola. 22 (2): 54-57.

AGRAMONTE, D.; F. JIMENEZ; M. A. DITA. 1998. Acimatización. En: Pérez Ponce, J. N. (ed.). Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Geo, Cuba. p. 193-201.

AL-JUBOORY, K.J.; D. J. WILLIANS; R. M. SKIRVIN. 1991. Growth regulator influence root and shoot development of micropropagated Algerian Ivy (*Hedera canariensis* L.). HortScience. 26: 1079-1080.

AL-JUBOORY, K.J.; J. S. SAWWAN; R. A. SHIBLI; R. M. SKIRVIN; D. J. WILLIANS. 1997. Influence of auxins and commercial rooting powder on rooting of Algerian Ivy (*Hedera canariensis*). PGRSA Quarterly. 25 (1): 23-31.

AMANCIO, S. J., P. REBORDAO; M. M. CHAVES. 1999. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 58: 31-37.

ANGUENOT, R. 2003. Protocolos, sucrose synthase. [En-línea][Visitado en enero, 2003]. Disponible en URL: (<http://www.agrobiotheque.ca /Protocolos/enzymo/sucrosesynthase.html>).

ANON, J. 1984. Energy data conversion handbook: how to combine and compare international energy data. Coombs, En: J.; D. O. Hall; S. P. Long (eds). Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis. Pergamon Press. pp. 258.

BALL, V. 1998. Media mixes. En: Vic Ball (ed.). Ball Redbook Publishing, pp. 802.

BARBER, J. 1994. Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. Australian Journal Plant Physiology. 22: 201-208.

BLANKE, M.; A. BELCHER. 1989. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 19: 85-89.

BORLAND, A. M. A. 1996. Model for the partitioning of photosynthetically fixed carbon during the C₃ - CAM transition in *Sedum telephium*. New Phytology. 134: 433-444.

BRAINERD, K. E.; L. H. FUCHIGAMI. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. Journal American Society Horticultural Science. 106: 515-518.

BURNER, D. M. 1992. Regeneration and phenotypic variability of plants cultured *in vitro* from mature sugarcane caryopses. Journal American Society Sugarcane Technical. 12: 82-90.

CABRERA, M.; V. MEDEROS; M. GARCIA; E. ESPINOSA; J. LOPEZ; J. C. VENTURA; L. DEL SOL; M. OLIVA; H. TOLEDO; Y. TORRES. 1999. Acclimatización de vitroplantas de Yuca (*Manihot esculenta*, Crantz). Libro de Reportes Cortos, V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. pp. 170-171.

CAPELLADES, M.; R. LEMEUR; P. C. DEBERGH. 1991. Effect of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in Rosa cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 25: 21-26.

CARVALHO, L. C.; M. L. OSORIO; M. M. CHAVES; S. AMANCIO. 2001. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and plantlets under *ex vitro* acclimatization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 67: 271-280.

CARVALHO, L. C.; S. AMANCIO. 2002. Antioxidant defense system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light and CO₂ concentration. Plant Science. 162 (1): 33-40.

CASTILLO, R. 2001. La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la

semilla artificial. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. pp.105.

CHEN, J.; M. ZIV. 2003. Carbohydrate, metabolic, and osmotic changes in scaled-up liquid cultures of *Narcissus* leaves. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 39: 645-650.

CLARKE, M. M.; A. E. LESLIE. 1996. Sugar beet and sugarcane as renewable resource. En: Fuller, G.; A. T. Mckeen, D. Donald. (eds.). *Agricultural materials as renewable resources*. pp. 229-247.

COMPANIONI, B.; R. RODRIGUEZ; Y. RODRIGUEZ; O. BORRAS; M. C. PEREZ; R. BECKER. 1998. Influencia de la esterilización parcial del sustrato y de su combinación con *Trichoderma viride* en la fase de adaptación de *Syngonium* sp. *Cuadernos de Fitopatología*. 15 (58): 135-137.

CONOVER, C. A.; R. T. POOL. 1984. Acclimatization of indoor foliage plants. *Horticultural Review*. 6: 119-154.

COURNAC, L.; B. DIMON; P. CARRIER; A. LOHOU; P. CHAGVARDIEFF. 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO₂ enrichment. *Plant Physiology*. 97: 112-117.

CRAFTS-BRANDNER, S. J.; M. E. SALVUCCI. 2002. Sensitivity of photosynthesis in a C₄ plant, maize, to heat stress. *Plant Physiology*. 129: 1773-1780.

DARY, B.; Y. DESJARDINS. 2001. Sucrose supply enhances phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation level in *in vitro* *Solanum tuberosum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67: 235-242.

DARY, B.; Y. DESJARDINS; L. VAN QUY. 2001. Sucrose enhances phosphoenolpyruvate activity of *in vitro* *Solanum tuberosum* L. Under non-limiting nitrogen conditions. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 37:180-189.

DE LA FE, C. F.; R. ORTIZ; M. JIMENEZ. 1998. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. II. Efecto de análogos de brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas. *Cultivos Tropicales*. 19 (3): 45-48.

DE RIECK, J.; O. VAN CLEEMPUT; P. C. DEBERGH. 1991. Carbon metabolism of micropropagated *Rosa multiflora*. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant.* 27: 57-63.

DEBERGH, P. C. 1991. Acclimatization technique of plants from *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 289: 291-300.

DEBERGH, P. C.; R. H. ZIMMERMAN. 1991. Micropropagation, technology and application. En: Debergh P.C; R. H. Zimmerman (eds). *Micropropagation*, pp. 45-69.

DEBERGH, P. C.; J. DE MEESTER; J. DE RIECK; S. JILLIS; J. VAN HUYLEMBROECK. 1992. Ecological and physiological aspects of tissue-cultured plants. *Acta Botany*. 41 (4): 417- 423.

DENG, R.; R. DANIELLE; J. DONNELLY. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Canadian Journal Plant Science*. 73: 1105-1113.

DESJARDINS, Y. 1995 a. Factors affecting CO₂ in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 1 (1): 13-21.

DESJARDINS, Y. 1995 b. Photosynthesis *in vitro* on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulturae*. 39: 345-353.

DESJARDINS, Y.; A. GOSSELIN; S. YELLE. 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ enriched environments and supplementary lighting. *Journal American Society Horticultural Science*. 112 (5): 846-851.

DESJARDINS, Y.; C. HDIDER; J. DE RIEK. 1996. Carbon nutrition *in vitro* regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems.

En: Aitken Christie, J.; T. Kozaj; M. L. Smith (eds). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwers Academic Publishers. pp. 441-471.

DESJARDINS, Y.; F. LAFORGE; C. LUSSIER; A. GOSSELIN. 1988. Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue culture strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Horticulturae*. 230: 45-53.

DONNELLY, D. J.; W. E. VIDAVER. 1984. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. *Journal American Society Horticultural Science*. 109: 177-181.

DONNELLY, D. J.; W. E. VIDAVER; K. LEE. 1995. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 4: 43-50.

DREW, R. A.; J. A. CONSIDINE; J. A. MCCOMB. 1993. Effect of fructose on growth of papaw shoot explants *in vitro*. *Australian Journal of Botanic*. 41: 739-748.

DU, Y. C.; A. NOSE; K. WASANO; Y. UCHIDA. 1998. Response to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis, the Calvin cycle and C₄ Pathway in sugarcane (*Saccharum* sp.). *Australian Journal Plant Physiology*. 25: 253-260.

ECHEVERRIA, E.; C. D. BOYER. 1986. Localization of starch biosynthesis and degradative enzymes in maize leaves. *American Journal of Botanic*. 73: 167-171.

ESCALONA, M. 1999. Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. pp.100.

ESCALONA, M.; J. C. LORENZO; M. DAQUINTA; J. L. GONZALEZ; M. CID; Z. FUNDORA; C. G. BORROTO. 2001. Factores relacionados con la propagación de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Libro de Reportes Cortos. 5to Coloquio Biotecnología Vegetal. Santa Clara. 160-162.

ESTRADA-LUNA, A. A.; F. T. DAVIES; J. N. EGILLA. 2001. Physiological change and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 17-24.

ETIENNE, E.; C. TEISSON; D. ALWARD; M. LARTAUD; M. BERTHOULY; F. GEORGET; M. ESCALONA; J. C. LORENZO. 1999. Temporary immersion for plant tissue culture. En: Altman, A.; M. Ziv; S. Izhav (eds.). *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st*. Kluwers Academic Publishes. pp. 629-632.

ETIENNE, E.; W. SOLANO; A. PEREIRA; B. BERTRAND; M. BERTHOULY. 1997. Coffea *in vitro* plantlets acclimatization protocols. *Plantations Recherché Developmental*. 4: 304-311.

ETIENNE, H.; M. BERTHOULY. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 215-231.

EXPOSITO, L.; M. HIDALGO; Q. DOMINGUEZ; C. G. BORROTO; R. GONZALEZ. 1993. Determinación de sustrato óptimo para la inoculación de Micorrizas Vesículas-Arbuscular (MVA) en vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr) cv. Cayena lisa. Memorias del 1^{er} Simposio Latinoamericano de Piñicultura, Cali, Colombia. pp. 25-29.

FILA, G.; J. GHASHGHAIE; J. HOARAU; G. CORNIC. 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiologia Plantarum*. 102: 411-418.

GALVEZ, G.; R. ALMEIDA. 1996. Vitroplantas: La biotecnología al alcance del productor cañero. Cañaveral, Cuba. Enero-Marzo, pp. 4-7.

GASPAR, T.; C. KEVERS; P. C. DEBERGH. 1987. Vitrification, morphological, physiological and ecological aspects. En: Bonga, J. M.; D. J. Durzan. (eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol I. Martinus Nijhoff Publishing. pp. 152-166.

GEIGENBERGER, P.; M. STITT. 1991. A futile cycle of sucrose synthesis and degradation is involved in regulating partitioning between sucrose starch and respiration in cotyledons of germinating *Recinus comunis* L. seedlings when phloem transport is inhibited. *Planta*. 185: 81-90.

GRANNOUM, O.; S. V. CAEMMERER; L. H. ZIZKA; J. P. CONROY. 2000. The growth response of C₄ plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant, Cell and Environmental*. 23: 931-942.

GONZALEZ-OLMEDO, J.; A. CORDOVA; C. A. ARAGON; D. PINA; M. RIVAS; R. RODRIGUEZ. 2005. Efecto de una análogo de brasinoesteroides sobre plantas de banano (*Musa* spp.) bajo estrés térmico. pp. 12.

GONZALEZ, R.; Q. DOMINGUEZ; L. A. EXPOSITO; J. L. GONZALEZ; T. MARTINEZ; M. HIDALGO. 1995. Efectividad de ocho cepas de *Azotobacter* sp. en la adaptación de vitroplantas de piña cv. Cayena lisa. *Centro Agrícola*. 22 (3): 68-75.

GROF, C. P. L.; J. A. CAMPBELL. 2001. Sugarcane metabolism: scope for molecular manipulation (Review): *Australian Journal Plant Physiology*. 28: 1-12.

GROUT, B. W.; H. ASTON. 1977. Transplanting of cauliflower regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Horticultural Review*. 17: 1-7.

GROUT, B. W.; S. MILLAM. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annual Botanic*. 55: 129-181.

GROUT, B. W.; M. E. DONKIN. 1987. Photosynthetic activity of cauliflower meristem culture *in vitro* and at transplanting into soil. *Acta Horticulturae*. 212: 323-327.

HAISE, D.; J. POSPISILOVA; H. SYNKOVA; J. CATSKY; N. WILHELMOV; S. PLZAKOVA. 1999. Photosynthetic pigments and gas exchange of *in vitro* grown tobacco plants as affected by CO₂ supply. *Biologia Plantarum*. 42 (3): 463-468.

HARTMANN, H. T.; D. E. KESTER; F. T. DAVIES; R. L. GENEVE. 1997. Plant Propagation. Principles and Practices. Sixth Edition, Prentice Hall Upper Saddle River. pp. 425.

HATCH, M. D. 2002. C₄ photosynthesis: discovery and resolution. Minireview, *Photosynthetica Research*. 73: 251-256.

HDIDER, C.; Y. DESJARDINS. 1994. Changes in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities and ¹⁴CO₂ fixation during the rooting of strawberry shoots *in vitro*. *Canadian Journal of Plant Science*. 74: 827-831.

HDIDER, C.; Y. DESJARDINS. 1995. Reduction of ribulose 1-5 bisphosphate carboxilase/oxigenase efficiency by the presence of sucrose during the tissue culture of strawberry plantlets. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 31: 165-170.

HEO, J. W.; C. KUBOTA; T. KOZAI. 1996. Effects of CO₂ concentration, PPFD and sucrose concentration on *Cymbidium* plantlet growth *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 440: 559 -566.

HERRERA, L.; R. HERNANDEZ; H. GRILLO. 1994. Problemas fitosanitarios del banano, la papa, la caña de azúcar y el ajo en la fase de adaptación de vitroplantas. *Centro Agrícola*. 2: 92-95.

HORONKOVA. M.; H. ZAHRADNICKOVA; P. SIMEK; A. HEYDOVA. 2003. The role of abscisic in acclimation of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 46(4): 535-541.

JEONG, B. R.; K. FUJIWARA; T. KOZAI. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Horticultural Review*. 17: 123-170.

JEONG-HOO, S.; C. YONG-YI; T. KOZAI; P. KEE-YOEUP. 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 61: 135-142.

JIMENEZ, E. 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp. hibrido*). Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. pp 100.

JIMENEZ, E.; N. PEREZ; M. DE FERIA; R. BARBON; A. CAPOTE; M. CHAVEZ; E. QUIALA; J. C. PEREZ, 2000. Improved production of potatoes microtubers using temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 59: 19-23.

KADLECEK, P., I. TICHA; D. HASEL; V. CAPKOVA; C. SCHAFFER. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science*. 161: 695-701.

KINGSTON-SMITH, A. H.; R. P. WALKER; C. POLLOCK. 1999. Invertase in leave: conundrum or control point?. *Review Journal of Experimental Botanic*. 50 (335): 735-743.

KIRDMANEE C.; C. KITAYA; T. KOZAI. 1994. Rapid acclimatization of *in vitro* plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity *ex vitro*. En: Kozai, T.; Y. Kitaya; C. Kubota. (eds.). *Collected papers on environmental control in micropropagated*. Editorial Gemhua Niu. 3: 957-958.

KIRDMANEE, C.; C. KITAYA; T. KOZAI. 1995 a. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 31: 144-149.

KIRDMANEE, C.; Y. KITAYA; T. KOZAI. 1995 b. Rapid Acclimatization of *Eucalyptus* plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity. *Environmental Control in Biology*. 33 (2): 123-132.

KOTVUN, T.; J. DAIE. 1995. End-product control of carbon metabolism in culture-grown sugar beet plants. *Plant Physiology*. 108: 1647-1656.

KOZAI, T. 1991. Acclimatization of micropropagated plants. En: Y. P. S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High Tech. and Micropropagation I*, Springer Verlag pp. 157-171.

KOZAI, T.; B. R . JEONG 1993. Environmental control in plant tissue culture and its application for micropropagation. En: Kozai, T.; Y. Kitaya; K. Fujiwara (eds.). *Collected papers on environmental control in micropropagation*. *Genhua Niu*. 2: 518-539.

KOZAI, T.; K. FUJIWARA; G. GIACOMELLY 1991. Environmental control in micropropagation . Annual America Society of Agronomic Engineers Meeting. pp.13.

KOZAI, T.; K. FUJIWARA; I. WATANABE. 1986. Fundamentals studies on environments in plant tissue culture vessels. Effect of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels with stoppers. *Journal Agricultural Meteorology*. 42: 119-127.

KOZAI, T.; K. FUJIWARA; M. HAYASHI; J. AITKEN- CHRISTIE. 1992. The *in vitro* environment and its control in micropropagation. En: Kurata, T.; T. Kozai (eds.). *Transplant Production Systems*, Kluwer Academic Publishers. pp. 36.

KOZAI, T.; M. A. L. SMITH. 1995. Environmental control in plant tissue culture: general introduction and overview. En: Aitken–Christie, J.; T. Kozai; M. A. L. Smith (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, Kluwer Academic Publishers. pp. 301-318.

KOZAI, T.; S. M. A. ZOBAYED. 2000. Acclimatization. En: Spier, R. E., (ed.). *Encyclopedia of Cell Technology*. John Wiley & Sons, Inc, Vol. 1: 1-12.

KOZAI, T.; Y. KITAYA; K. FUJIWARA; J. A. DEBERGH. 1995 b. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. En: Terzi, M.; R. Cella; A. Falavigna (eds.). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Dordrecht, pp. 659-667.

KOZAI, T.; Y. KITAYA; K. FUJIWARA; M. A. L. SMITH; J. AITKEN-CHRISTIE. 1995 a. Environmental measurement and control systems. En: Aitken-Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, Kluwers Academic Publishers. pp. 539-574.

KURASOVA, I.; M. CAJAREK; J. KALINA; O. URBAN; V. SPUNDA. 2002. Characterization of acclimatization of *Hordeum vulgare* to high irradiation based on different response of photosynthesis activity and pigment composition. *Photosynthesis Research*. 72: 71-83.

KWA, S. H.; Y. C. WEE; T. M. LIM; P. P. KUMAR. 1995. Establishment and physiological analyses of phototrophic callus of the fern *Platynerium coronarium* (Koenig) development under CO₂ enrichment. *Journal Experimental Botanic*. 46: 1535-1542.

LEE, N.; Y. WETZSTEIN; H. E. SOMMER. 1985. Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* (L.) towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*. 78: 637-641.

LEE, V. G.; G. SAMSON; Y. DESJARDINS. 2001. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiance and CO₂ concentration. *Plant Physiology*. 158: 599-605.

LEES, R. P.; E. H. EVANS; R. G. BROWN. 1991. A study of the chlorophyll fluorescence from mature and micropropagated Clematis by time-resolved spectroscopy. *Journal Photochemistry Photobiology*. 8: 307-313.

LEVITT, J. 1980. Responses of plant to environmental stress, Vol. II, Water, Radiation, Salt and others Stresses. Academic Press, New York. pp. 203.

LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54(3):197-200.

LORENZO, J. C. 2000. Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en sistemas de inmersión temporal y su relación con la excreción de fenoles. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila: Centro de Bioplasmas. pp 100.

LU, C.; J. ZHANG. 2000. Photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. *Plant Science*. 151: 135-143.

LUNN, J. E.; E. MACRAE. 2003. New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 208-214.

LUNN, J. E.; R. T. FURBANK. 1997. Localization of sucrose phosphate synthase and starch in leaves of C₄ plants. *Planta*. 202: 106-111.

MAJADA, J. P.; F. TADEO; M. A. FAL; R. SANCHEZ-TAMES. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63: 207-214.

MAJADA, J. P.; M. I. SIERRA; R. SANCHEZ-TAMES. 2001. Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Scientia Horticulturae*. 87: 121-130.

MARIN, J. A.; R. GELLA; M. HERRERO. 1988. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Annual Botany*. 2: 663-670.

MARTRE, P.; D. LACAN; D. JUST; C. TEISSON. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67: 25-35.

MAXWELL, K.; J. L. MARRISON; R. M. LEECH; H. GRIFFITHS; P. HORTON. 1999. Chloroplast acclimatization in leaves of *Gusmania monostachia* in response to high light. *Plant Physiology*. 121: 89-95.

MCCLELLAND, M. T.; M. A. L. SMITH; Z. B. CAROTHERS. 1990. The effects of *in vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in tree woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 23: 115-123.

MEINZER, F. C.; J. ZHU. 1998. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C₄ CO₂ concentrating system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. *Journal of Experimental Botany*. 49(324): 1227-1234.

MILLER, A.; C. TSAI; D. HEMPHILL; M. ENDRES; S. RODERMEL; M. SPALDING. 1997. Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny. A new perspective on acclimatization. *Plant Physiology*. 119: 1195-1200.

MINAGRI. 1994. Norma Ramal de la Agricultura (1). Manual de análisis químico para humus de lombriz, abonos y sustratos orgánicos. La Habana, Cuba. pp. 34.

MIRON, D.; A. A. SCHAFFER. 1991. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon hirsutum* Humb. *Plant Physiology*. 95: 623-627.

MOORE, P. H.; A. MARETZKI. 1999. Sugarcane. En: Zamski E.; A. A. Schaffer (eds). Photoassimilate distribution in plants and crops. 27: pp. 643-665.

MURATA, Y. 1981. Dependence of potential productivity and efficiency for solar energy utilization on leaf photosynthetic capacity in crop species. Japan Journal Crop Science. 50: 223-232.

NGUYEN-QUOC, B.; C. H. FOYER. 2001. A role for "futile cycles" involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of Tomato fruit. Journal of Experimental Botany. 50 (335): 735-743.

NGUYEN-QUOC, B.; M. KRIVITZKY; S. C. HUBER; A. LECHARNY. 1990. Sucrose synthesis in developing Maize leaves. Plant Physiology. 94: 516-523.

NIEVES, H.; M. SEGURA-NIETO; M. A. BLANCO; M. SANCHEZ; A. GONZALEZ; R. CASTILLO. 2003. Biochemical characterization of embryogenic and no-embryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 39 (3): 343-345.

O'BRIEN, T. P.; M. E. McCULLY. 1981. The study of plant structure. Principles and selected methods. Termarcarphi PTY. Ltd., Melbourne Australia. pp. 268.

OJEDA, E.; A. VEGA. 1999. Sistema integral de producción de semilla. Cañaveral. 5(1): 54-58.

ORTEGA, E.; R. RODES. 1990. Técnica de medición de la apertura de los estomas. Folleto de Prácticas de Fisiología Vegetal. Ed. Pueblo y Educación. pp 193.

ORTIZ, R.; C. DE LA FE; D. LARA. 1998 a. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. I. Sustrato más eficiente para la adaptación de vitroplantas. Cultivos Tropicales. 19 (2): 45-49.

ORTIZ, R.; C. DE LA FE; D. LARA. 1998 b. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. III. Uso de fertilizantes y manejos de las vitroplantas en la fase de adaptación. Cultivos Tropicales. 19(3): 49-53.

OSMUND, C. B.; J. A. M. HOLTUM. 1981. Crassulacea acid metabolism. En: Hatch M. D.; N. K. Boardman (eds.). Biochemistry of plants. New York: Academic press. pp. 283-328.

PAUL, J. M.; T. K. PELLNY. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. Journal of Experimental Botany. 54 (382): 539-547.

PAUL, M.; M. STITT. 1993. Effects of nitrogen and phosphate deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response of exogenous sucrose. Plant Cell Environment. 16: 1047-1057.

PEREZ, J.; F. JIMENEZ; D. AGRAMONTE. 1999. Aclimatización (fase IV). Características y problemas. Libro de Reportes Cortos, V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. pp. 188-189.

PORRAS, R. J. 1991. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. En: Scheer H. (ed.). Chemistry of Chlorophyll. CRC Press Inc. Boca Raton. Ann. Arbor Boston London. pp. 320.

POSPISILOVA, J.; H. SYNKOVA; D. HASEL; J. CATSKY; N. WILHELMOVA; F. SRAMEK. 1999. Effect of elevated CO₂ concentration on acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. Journal of Experimental Botany. 50 (30): 119-126.

POSPISILOVA, J.; J. CATSKY; Z. SESTAK. 1997. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. En: Pessaraki, M. (ed.). Handbook of photosynthesis, Marcel Dekker. pp. 525-540.

POSPISILOVA, J.; J. SOLAROVA; J. CATSKY. 1992. Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica*. 26 (1): 3-18.

PREECE, J. E.; E. G. SUTTER. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C.; R. H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. pp. 71-93.

PREMKUMAR, A.; A. BARCELO-MUÑOZ; F. PLIEGO-ALFARO; M. A. QUESADA; J. A. MERCADO. 2002. Influences of exogenous sucrose on juvenile avocado during *in vitro* cultivation and subsequent *ex vitro* acclimatization. *Trees*. 16: 569-575.

QUESADA, P.; J. MACHADO; M. MORALES; Y. ALEMAN; M. TOLEDO. 1998. Utilización de fibras en la formulación de sustratos para vitroplantas de plátano. *Centro Agrícola*. 2: 64-68.

RIVAL, A.; C. CREING; D. GOSELLIN. 1998. Growth and carboxylase activities in *in vitro* micropropagation oil palm plantlets during acclimatization: comparison with conventionally germinated seedlings. *Advance Horticulture Science*. 12: 111-117.

ROBERTS, A. V.; S. WALKER; I. HORAN; E. F. SMITH; E. F. MONTTLEY. 1992. The effect of growth retardants, humidity and lighting at stage III on stage IV of micropropagation in Chrysanthemum and Rose. *Acta Horticulturae*. 319: 153-158.

ROBERTSON, M. J.; G. D. BONNETT; R. M. HUGHES; R. C. MUCHOW; J. A. CAMPBELL. 1998. Temperature and leaf area expansion of sugarcane: integration of controlled-environment, field and model studies. *Australian Journal Plant Physiology*. 25: 819-825.

RODES, R.; B. HIEKE. 1987. Actividad fotosintética y respiratoria en plantas de soya, maíz y caña de azúcar, determinadas por métodos manométricos y de análisis infrarrojo de gases. *Centro Agrícola*. 32: 55-64.

RODRIGUEZ R., J. L. GONZALEZ; Y VELAZQUEZ; N. NIEVES. 1998. Empleo de reguladores del crecimiento en vitroplantas y estacas de *Ixora coccinea*. (L.) cv. Guillermina. Agrícola Vergel. 51: 501-502.

ROSS-KARSTENS, G. S.; G. EBERT; P. LUDDERS. 1998. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 4 (1): 21-27.

SANTANA, I.; O. NODARSE; H. E. RODRIGUEZ; R. CHINEA. 1996 a. Biotecnología al servicio de la producción cañera. Cuba y Caña. 3: 3-8.

SANTANA, N.; S. CORTEZ; J. V. MARTIN; S. MONTES. 1996 b. Adaptación de vitroplantas de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catimor (9722). Cultivos Tropicales. 17 (2): 83-85.

SEKO, Y.; T. KOZAI. 1996. Effect of CO₂ enrichment and sugar-free medium on survival and growth of *Tufo grass regenerants* grown *in vitro*. Acta Horticulturae. 440: 600-605.

SEON, J. H., Y. CUI; T. KOZAI; K. PAEK. 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 61: 135-142.

SERRET, M. D.; M. I. TRILLAS; J. L. ARAUS. 2001. The effect of *in vitro* culture conditions on the pattern of photoinhibition during acclimatization of gardenia plantlets to *ex vitro* conditions. Photosynthetica. 39 (1): 67-73.

SERRET, M. D.; M. I. TRILLAS; J. MATAS; J. L. ARAUS. 1997. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 45: 1-16.

SESTAK, Z.; J. CATSKY; P. G. JARVIS. 1971. Plant photosynthetic production. En W. Junk (ed.). Manual of Methods. N. V. Publishers. pp. 519.

SKALABAU, V. D. 1991. Metodología para la determinación de las propiedades hidrofísicas fundamentales de los suelos. *Revista Meteorología e hidrología*. 2: 92-99.

SORRETINO, G.; L. CERIO; A. ALVINO. 1997. Effect of shading and air temperature on leaf photosynthesis fluorescence and growth in Lily plant. *Scientia Horticulturae*. 69: 259-273.

SPILATRO, S. R.; J. PREISS. 1987. Regulation of starch synthesis in the bundle sheath and mesophyll of *Zea mays* (L.) Intercellular compartmentalization of enzymes of starch metabolism and the properties of ADPglucose pyrophosphorilases. *Plant Physiology*. 83: 621-627.

SUTTER, E. G. 1985. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 27: 52-56.

SYVERTSEN J.; M. L. SMITH. 1984. Light acclimation in citrus leaves. I. Changes in physical characteristics, chlorophyll and nitrogen content. *Journal American Society Horticultural Science*. 109(6): 807-812.

TALBOTT, L. D.; E. RAHVEH; E. ZEIGER. 2003. Relative humidity is a key factor in the acclimation of the stomatal response to CO₂. *Journal of Experimental Botany*. 54(390):2141-2147.

TALLMAN, G. 2004. Are diurnal patterns of stomatal movement the result of alternating metabolism of endogenous guard cell ABA and accumulation of ABA delivered to the apoplast around guard cells by transpiration. *Journal of Experimental Botany*. 55 (405): 1963-1976.

TERAN, Z.; G. GRASS; R. PLANA. 1996. Sustrato más eficiente con zeolita para la adaptación de vitroplantas de caña de azúcar. *Cultivos Tropicales*. 17 (3): 47-51.

TICHA, I.; B. RADOCHOVA; P. KADLECEK. 1999. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (3): 469-474.

TREVANION, S. J.; C. K. CASTLEDEN; C. H. FOYER; R. T. FURBANK; W. P. QUICK; J. E. LUNN. 2004. Regulation of sucrose-phosphate synthase in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Functional Plant Biology*. 31: 685-695.

ULMAN, P.; J. CATSKY; J. POSPASILOVA. 2000. Photosynthetic traits in wheat grown under decreased and increased CO₂ concentration, and after transfer to natural CO₂ concentration. *Biologia Plantarum* 43 (2): 227-237.

URQUIZA, M.; A. FERNANDEZ; Y. A. GONZALEZ. 1980. Estudio comparativo de cuatro métodos de determinación de carbono orgánico en suelos. *Ciencia y Técnica de la agricultura*. 3 (11): 29-40.

VADIUNINA, A. F.; Z. A. KORCHAQUINA. 1986. Métodos de investigación de las propiedades físicas de los suelos. *Agropromizdat*. 2: 414-126.

VAN DILLEWIJN. 1951. *Botánica de la Caña de Azúcar*. Ed. Revolucionaria. pp. 435.

VAN HANDEL, E. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Annual Biochemistry*. 22: 280-283.

VAN HUYLENBROECK, J. M. 1994. Influence of light stress during the acclimatization of *in vitro* plantlets. En: Struik, P. C. (ed.). *Plant Production on the Threshold of a New Century*. Kluwer Academic Publishers. pp. 451-453.

VAN HUYLENBROECK, J. M.; A. PIQUERAS; P. C. DEBERGH 1998. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*. 134: 21-30.

VAN HUYLENBROECK, J. M.; A. PIQUERAS; P. C. DEBERGH. 2000. The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science*. 155: 59-66.

VAN HUYLENBROECK, J. M.; H. HUYGEN; P. C. DEBERGH. 1995. Photoinhibition during acclimatization of *Spathiphyllum* Petite plantlets. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 31: 160-164.

VAN HUYLENBROECK, J. M.; J. DE RIEK. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets. *Plant Science*. 111: 19-25.

VAN HUYLENBROECK, J. M.; P. C. DEBERGH. 1992. Acclimatization of micropropagated *Gerbera jamesonii* use of chlorophyll fluorescence. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. 57/4a: 1575-1579.

VANDERSCHAEGHE, A. M.; P. C. DEBERGH. 1987. Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. En: Ducate, G.; M. Jacob; A. Simeon (eds.). *Plant micropropagation in Horticultural Industries*. Presses Universitaires. pp. 68-76.

VERTESY, J.; I. BALLA. 1987. Acclimatization of woody plants under continental climatic conditions. *Acta Horticulturae*. 212: 40-45.

VORACKOVA, Z.; H. LIPAVSKA; P. KONECNY. 1998. The efficiency of transfer of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions as affected by sugar supply. *Biology*. 41(4): 507-513.

WALDENMAIER, S.; G. SCHMIDT; J. ZHU. 1990. Histologische unterschiede zwischen *in-vitro* und *ex-vitro*-blättern bei der abhärtung von Rhododendron. *Gartenbau*. 55: 49-54.

WALTING, J. R.; M. C. PRESS; P. QUICK 2000. Elevated CO₂ induces biochemical and Ultrastructural changes in leaves of the C₄ Cereal Sorghum. *Plant Physiology*. 123: 1143-1152.

WARDLE, K.; A. QUINLAN; I. SIMPKINS. 1979. Abscisic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. Botritis, regenerated through apical meristem culture. *Annals of Botany*. 45: 745-752.

WATSON, R. T.; M. MARUFU; C. ZINYOWERA; R. H. MOSS. 1996. Climate change. Impacts adaptations and mitigation of climate change: scientific-technical analyses. Cambridge University Press. pp. 879.

WETZTEIN, H. Y.; H. E. SOMMER. 1983. Scanning electron microscopy of the *in vitro*-culture *Liquidambar styraciflua* plants during acclimatization. Journal American Society Horticultural Science. 108: 475-480.

WHITTLE, J. 1987. Physical and chemical properties of peat. Proceeding international Plant Society. 36: 284-287.

XIAO, Y.; Y. H. LOK; T. KOZAI. 2003. Photoautotrophic growth of sugarcane plantlets *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 39 (2): 186-192.

YANES E.; J. L. GONZALEZ-OLMEDO; R. RODRIGUEZ. 2000. Light Management During Acclimatization of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. Cayena lisa 'Serrana' Vitroplants. Pineapple News. 7: 3-5.

YUE, D.; A. GOSSELIN; Y. DESJARDINS. 1993. Effects of forced ventilation at different relative humidities on growth, photosynthesis and transpiration of geranium plantlets *in vitro*. Canadian Journal Plant Science. 73: 249-256.

YUE, D.; Y. DESJARDINS; M. LAMARRE; A. GOSSELIN. 1992. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. Scientia Horticulturae 49: 9-16.

ZEBIAN, K. J.; E. G. REEKIE. 1998. The interactive effects of atmospheric carbon dioxide and light on stem elongation in seedling of four species. Annals of Botany 81: 185-183.

ZIV, M. 1991. Vitrification. En: Debergh P. C; R. H. Zimmerman (eds.). Micropropagation Technology and application. Kluwer Academic Publishers. pp. 45-69.

ZIV, M. 1992 a. The use of growth retardants for the regulation and acclimatization of *in vitro* plants. En: Karsen, C. M.; L. C. Van Loon; D.

Vruengdenhill (eds.). Progress in Plant Growth Regulation, Kluwer Academic Publishers. pp. 809-817.

ZIV, M. 1992 b. Morphogenic control of plants micropropagated in biorreactors cultures and its impact on acclimatization. *Acta Horticulturae*. 319: 119-124.

ZIV, M. 1995. *In vitro* acclimatization. En: Aitken-Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds.). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. pp. 493-516.

ZIV, M.; A. SCHWARTS; D. FLEMINGER. 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Science*. 52: 127-134.

ZIV, M.; T. ARIEL. 1994. Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. En: Lumsden, P. J.; J. R. Nicholas; W. J. Davies (eds.) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer Academic Publishers. pp. 143-154.

Anexos



Rionegro, 15 de abril de 2005

Ingeniero

ROMELIO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

Universidad Ciego de Avila
Ciego de Avila
Cuba

Referencia: Aval de la tesis titulada: "Aclimatización de Plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal" en Opción grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

Apreciado Romelio

Adjunto te remito el certificado correspondiente al aval de la tesis en mención.

Por favor me confirmas la recepción.

Cordialmente,

Dagoberto Castro R.
Jefe Unidad de Biotecnología
Universidad Católica de Oriente

AVAL TESIS: "Aclimatización de Plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal"

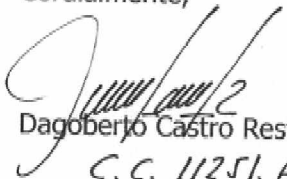
DAGOBERTO CASTRO RESTREPO, Ingeniero Agrónomo, Ph.D., Jefe e investigador de la Unidad de Biotecnología de la Universidad Católica de Oriente, Rionegro (Antioquia) – COLOMBIA, certifica conocer el desarrollo y documentación del trabajo de tesis para optar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas titulado: "Aclimatización de Plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal" presentado por el Ingeniero agrónomo y Msc. Romelio Rodríguez Sánchez bajo la tutoría del Dr. Justo L. González Olmedo.

Considero que el trabajo que realizó el Ingeniero Romelio Rodríguez, es de vital importancia para el sector cañicultor y de manera muy particular por su aporte tanto científico; así como en lo práctico, debido al estudio del mejoramiento de la calidad fisiológica y de la supervivencia de las plántulas micropropagadas en los biorreactores de inmersión temporal.

Desde el punto de vista científico se presentan valiosos aportes sobre el comportamiento de las plántulas de caña de azúcar propagadas en los BIT, durante la fase de Aclimatización. Los estudios sobre los cambios morfofisiológicos y bioquímicos de las plántulas en el momento de salida de la fase *in vitro* permitieron explicar el efecto de variables como la intensidad lumínica y la humedad relativa sobre la supervivencia y el desarrollo de las plántulas, lo cual contribuye a la ciencia, pues en la literatura, es muy escasa la información al respecto.

En general el rigor científico utilizado por el Ing. Rodríguez en su trabajo, merece una especial mención y refleja una gran preparación científica, lo cual permite prever que podrá abordar con éxito nuevos desafíos.

Cordialmente,



Dagoberto Castro Restrepo.
C. C. 11251.686

Ph.D. Jefe Unidad de Biotecnología Vegetal
Universidad Católica de oriente
E- mail: dcastro@uco.edu.co

PRODUCCION CIENTIFICA DERIVADA DEL TEMA.

PROYECTOS:

- 1- CITMA Nacional. **Obtención de semilla de alta calidad. Semilla artificial en caña de azúcar. 1995-1999.**
- 2- MES. **Aclimatización de plántulas de caña de azúcar. 1998-2000**
- 3- CITMA Territorial. **Aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar provenientes de birreactores de inmersión temporal. 2000-2002**

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

- 1- III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO **1998.**
- 2- Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. Bioveg **1999-2001-2003-2005.**
- 3- Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal **2000-2002**
- 4- Seminario Científico INCA **1998-2000-2004.**
- 5- REDBIO **2001**
- 6- V Coloquio Internacional de azúcar y sus derivados **2003.**

TESIS.

Tesis de Maestría. Tecnología de aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar. (2000)

LIBROS:

Aclimatización Cap. 8. **En Lorenzo Feijoo, J. C. (ed). Biotecnología de la Caña de Azúcar: algunos aportes. Ciego de Ávila, Cuba, Centro de Bioplantas 2002. 178p. ISBN 959-16-0077-1.**

PATENTE:

Tecnología de aclimatización de caña de azúcar. Aprob. 25 Sept./02. Resol. No. 1723/ 2002. A01H 4/00.

PUBLICACIONES:

Rodríguez R.; **M. Escalona; Y. Rodríguez; M. Cid; D. Pina; J. L. González-Olmedo. 1999. Comportamiento de las plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) provenientes de Sistemas de Inmersión Temporal durante la fase de aclimatización. Libro de Reportes cortos, V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. 177-179.**

González-Olmedo, J. L.: **R. Rodríguez; Y. Rodríguez; E. Yáñez; M. Escalona 1999. Caracterización de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatización de plántulas de Piña y Caña de Azúcar. Libro de Reportes cortos, V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal.174-176.**

R. Rodríguez; **Maritza Escalona; Yania Rodríguez; Mariela Cid; J. L. González. 2000. Aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar**

(*Saccharum* sp. Híbrido) provenientes de sistemas de inmersión temporal. Cultivo Tropicales 21(3):51-56.

Rodríguez, R.; D. Pina; M. Cid; P. Marrero; N. Vázquez; J. L. González-Olmedo. 2001. Efecto del sustrato y la intensidad lumínica sobre la supervivencia y variables fisiológicas de las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización. Libro de Reportes Cortos BioVeg: p. 139.

González-Olmedo, J. L.; R. Rodríguez; J. Abdulnour; Y. Desjardins. 2001. Efectos de las condiciones ambientales sobre el crecimiento y la fotosíntesis de plántulas de caña de azúcar en aclimatización. Libro de Reportes Cortos BioVeg: p. 142.

R. Rodríguez, Mariela Cid, D. Pina, J. L. González, Y. Desjardins. 2003. Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. *In vitro Cellular and Development Biology Plant*, 39(6): 657-662.

Romelio Rodríguez, Carlos E. Aragon, Maritza Escalona, Justo L. Gonzalez-Olmedo, Yves Desjardins. 2005. Cambios fisiológicos y bioquímicos en plántulas de caña de azúcar durante la fase aclimatización. Libro de Reportes Cortos Bioveg: p. 78.

Romelio Rodríguez, Carlos E. Aragon, Maritza Escalona, Justo L. Gonzalez-Olmedo, Yves Desjardins. Carbon metabolism in sugarcane leaves during acclimatization phase. *In vitro Cellular and Development Biology Plant*. (en revision).

10/02/05

Director of the School of Graduate Studies
Universidad de Ciego de Avila
Ciego de Avila
Cuba

Object : Recommendation of the Ph.D. Thesis of Mr. Romelio Rodriguez Sanchez

Senor Director of graduate studies at the UNICA,

I have read the thesis of Mr. Romelio Rodriguez entitled « Acclimatization de plantulas de cana de azucar (*Saccharum* sp, hibrido) propagadas en biorreactores de

immersion temporal » and I recommend that it be accepted after minor revisions.

The thesis is well written and present interesting results on the conditions to provide

during the acclimatization to obtain a high success of survival of sugar cane plantlets.

The candidate has properly reviewed the pertinent scientific literature and has shown

its ability to synthesize, in a coherent manner, the different aspects related to the

acclimatization of sugar cane. The results presented by Mr. Rodriguez are innovative

and will certainly useful to improve the acclimatization of sugar cane originating from temporary immersion bioreactors.

Mr. Rodriguez did part of his Ph.D. studies in my laboratory. I can certify of his honesty, the constancy of his work and the strive and interest he has showed during

his stay in my laboratory. Despite some problems he encountered with our BIT system at Laval University, I can observed that the biochemical techniques he learned in our Center have been useful and have contributed to the successful preparation of this Ph.D. Thesis.

For all these reasons, I thus recommend that you grant the title of Ph.D. to Mr. Rodriguez with all the privileges this title confer.

I remain available for any further information in relation with this review.

Saludos amable,

Dr. Yves Desjardins, Ph.D., Agr.

Professeur titulaire

Directeur par interim CRH