

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ingeniería Eléctrica

Departamento de Automática y Sistemas Computacionales



TRABAJO DE DIPLOMA

**Estudio sobre el comportamiento de las condiciones ambientales y sus efectos en la
micropropagación de plantas**

Autor: Dibet García González

Tutor: Ph. D. Jorge Sánchez Bermúdez

M. Sc. Alberto Gómez Abreu

Santa Clara

2004

"Año del 45 aniversario del triunfo de la revolución"

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ingeniería Eléctrica

Departamento de Automática y Sistemas Computacionales



TRABAJO DE DIPLOMA

**Estudio sobre el comportamiento de las condiciones ambientales y sus efectos en la
micropropagación de plantas**

Autor: Dibet García González

E-mail: dibetgarcia@yahoo.com

Tutor: Ph. D. Jorge Sánchez Bermúdez

Prof. Auxiliar, Dpto. de Automática y Sistemas
Computacionales

Facultad de Ing. Eléctrica. UCLV.

E-mail: jorges@uclv.edu.cu

M. Sc. Alberto Gómez Abreu

Especialista Informático

CPA Ignacio Agramante y Loynaz

E-mail: otreb1a712003@yahoo.com

Santa Clara

2004

"Año del 45 aniversario del triunfo de la revolución"



Hago constar que el presente trabajo de diploma fue realizado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas como parte de la culminación de estudios de la especialidad de Ingeniería Automática autorizando a que el mismo sea utilizado por la Institución, para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos, ni publicados sin autorización de la Universidad.

Firma del Autor

Los abajo firmantes certificamos que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdo de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple con los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura referido a la temática señalada.

Firma del Autor

Firma del Jefe de
Departamento donde se
defiende el trabajo.

Firma del Responsable de
Información Científico-
Técnica.

PENSAMIENTO

"La paz viene como necesaria consecuencia del trabajo; pero el trabajo no se alimenta cuando no puede tener la esperanza de realizar y mejorar sus productos."

José Martí

"A los niños debiera enseñárseles a leer en esta frase: La agricultura es la única fuente constante, cierta y enteramente pura de riqueza."

José Martí

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS.

*T*antas son las personas a quien agradecer la realización exitosa de este trabajo que no cabrían aquí pero ahí algunas que no puedo dejar de mencionar por su apoyo incondicional y que siempre esperaron lo mejor de mí.

A mis padres, a mi hermano y a Mercy.

A Ileana y a Sergio.

A los doctores Orlando y Eladio.

A mis amigos Yoani y Alleini.

A mis tutores y a todos mis profesores.

A los compañeros del departamento de Aclimatización y de Bioinformática del Centro de Bioplantas.

A todos muchas gracias.

DEDICATORIA

DEDICATORIA.

A toda mi familia y a mis amigos.

TAREA TÉCNICA

TAREA TÉCNICA.

Las tareas que se deben de realizar para cumplir el objetivo general son:

1. Revisión de la situación del tema en la actualidad.
2. Estudio de la fotosíntesis, la respiración y la transpiración como los procesos más importantes relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas y como influyen las variables ambientales sobre los mismos.
3. Estudio de las etapas de la micropropagación.
4. Estudio de cómo se comportan la fotosíntesis, la respiración y la transpiración y cuales son los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en ambiente *in vitro*.
5. Montaje de un biorreactor de inmersión temporal y realizar un experimento donde se cultiven bajo cuatro condiciones ambientales distintas plantas de eucalipto y analizar su crecimiento.
6. Estudio del equipo de medición CIRAS-2 de la firma PP-System.
7. Estudio de cómo se comportan la fotosíntesis, la respiración y la transpiración y cuales son los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas en los biorreactores de inmersión temporal.
8. Comparar la realización de fotosíntesis de las plantas propagadas en el biorreactor de inmersión temporal con plantas jóvenes.
9. Confección del informe final y defensa del trabajo.

Firma del Autor

Firma del Tutor

RESUMEN

RESUMEN.

Se comienza un estudio de los efectos de las condiciones ambientales sobre la fotosíntesis, transpiración y respiración, como los procesos vinculados al crecimiento y desarrollo en las plantas. Se explica cómo se comportan las distintas variables ambientales que influyen en dichos procesos cuando las plantas son cultivadas en ambiente *ex vitro*, *in vitro* y dentro de los biorreactores de inmersión temporal.

Se montó un biorreactor de inmersión con el objetivo de mejorar las condiciones ambientales donde crecen las plantas para obtener un mayor porcentaje de supervivencia y poder hacer el estudio antes mencionado. Para ello se recuperó una tarjeta para el control de la iluminación y se programó un autómata para gobernar el biorreactor.

Los resultados de este trabajo demuestran que con un cultivo a altas intensidades de iluminación y concentraciones de CO₂ se puede obtener un 82% de plantas competentes para lograr un mayor porcentaje de supervivencia de plantas cuando son llevadas a casas de cultivo.

También se compararon las plantas propagadas en el biorreactor de inmersión con las crecidas en ambiente *ex vitro*, viéndose que las primeras, a pesar de tener una mejor calidad, no alcanzan todavía los niveles de realización de fotosíntesis que tienen las segundas.

ÍNDICE

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.....	2
1 INTRODUCCIÓN A LA MICROPROPAGACIÓN. LAS PLANTAS Y SU COMPORTAMIENTO EN AMBIENTE <i>EX VITRO</i>.....	6
1.1 SITUACIÓN DEL TEMA EN LA ACTUALIDAD.....	6
1.2 LA MICROPROPAGACIÓN, UNA TÉCNICA PARA EL CULTIVO DE PLANTAS.	7
1.2.1 <i>Funcionamiento de una biofábrica y las etapas de la micropropagación.</i>	7
1.2.2 <i>Las ventajas y desventajas de la micropropagación.</i>	9
1.3 EL COMPORTAMIENTO DE LAS PLANTAS EN AMBIENTE <i>EX VITRO</i>	12
1.3.1 <i>Las relaciones hídricas de las células.</i>	12
1.3.1.1 La difusión.	12
1.3.1.2 La difusión de los gases.	12
1.3.1.3 Los factores que influyen en la difusión de los gases.....	12
1.3.1.4 La difusión de los solutos.	13
1.3.1.5 Los factores que influyen en la difusión de los solutos.	13
1.3.1.6 La difusión de los líquidos. La ósmosis.....	14
1.3.1.7 El potencial hídrico.....	14
1.3.1.8 Los factores que afectan el potencial hídrico.....	15
1.3.1.9 Los estomas.....	15
1.3.1.10 Los factores que afectan el movimiento de los estomas.....	16
1.3.2 <i>Los procesos internos de las plantas (fotosíntesis, respiración y la transpiración)</i>	16
1.3.2.1 La fotosíntesis.....	17
1.3.2.2 Los factores que influyen en la actividad fotosintética.....	23
1.3.2.3 La transpiración.	29
1.3.2.4 Los factores que influyen sobre la intensidad de la transpiración.	30
1.3.2.5 La respiración.	30
1.3.2.6 Los factores que influyen sobre la intensidad de la respiración.	31
1.4 BREVE RESUMEN DEL CAPÍTULO.	33

2 LAS PLANTAS Y SU COMPORTAMIENTO EN AMBIENTE *IN VITRO*.....36

2.1 LAS VARIABLES DE UNA PLANTA Y SU COMPORTAMIENTO EN AMBIENTE <i>IN VITRO</i>	36
2.1.1 <i>La composición del medio de cultivo</i>	36
2.1.2 <i>La iluminación</i>	37
2.1.3 <i>La concentración de CO₂</i>	39
2.1.4 <i>La humedad relativa</i>	40
2.1.5 <i>La temperatura</i>	40
2.1.6 <i>La circulación del aire dentro del frasco de cultivo</i>	41
2.1.7 <i>La fotosíntesis</i>	41
2.1.8 <i>La transpiración</i>	41
2.1.9 <i>La respiración</i>	42
2.2 EL MONTAJE DEL BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL.	42
2.3 UN CIRCUITO PARA EL CONTROL DE LA FFF.....	43
2.4 LA CONCEPCIÓN DEL EXPERIMENTO.....	44
2.5 INSTRUMENTO DE MEDICIÓN CIRAS 2.....	45
2.6 BREVE RESUMEN DEL CAPÍTULO.	46

3 EL COMPORTAMIENTO DE LAS PLANTAS PROPAGADAS EN LOS BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL.49

3.1 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES CON EL USO DE LOS BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL.	49
3.1.1 <i>La composición del medio</i>	49
3.1.2 <i>La iluminación</i>	49
3.1.3 <i>La concentración de CO₂</i>	50
3.1.4 <i>La humedad relativa</i>	50
3.1.5 <i>La temperatura</i>	51
3.1.6 <i>La circulación del aire</i>	51
3.1.7 <i>La fotosíntesis</i>	51
3.1.8 <i>La transpiración</i>	52
3.1.9 <i>La respiración</i>	53
3.1.10 <i>Otras variables</i>	53

3.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS PLANTAS PROPAGADAS EN LOS BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL.	54
3.3 COMPARACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE REALIZACIÓN DE FOTOSÍNTESIS <i>IN VITRO</i> Y <i>EX VITRO</i>	55
3.4 BREVE RESUMEN DEL CAPÍTULO.	56
CONCLUSIONES.	58
RECOMENDACIONES.	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS.....	66
A GLOSARIO.	66
B FRASCOS DE CULTIVO.....	67
C AUTÓMATA Y SU PROGRAMA.....	68
D VÁLVULA TIPO SMC SY5420-5DZ-01F.....	69
E CIRCUITO PARA EL CONTROL DE LA FFF.....	70
F INSTRUMENTO DE MEDICIÓN CIRAS 2	71

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

En el mundo actual, la micropropagación es una técnica muy utilizada para la reproducción acelerada de especies vegetales. Este proceso aporta una serie de ventajas que superan las de la agricultura tradicional.

Independientemente de las ventajas existen una serie de desventajas que surgen fundamentalmente por las condiciones ambientales existentes en los frascos de cultivo lo que trae como consecuencia que no exista una buena adaptación de las plantas al ser llevadas a las casas de cultivo. Alrededor del 25% de las plantas sobrevive este cambio existiendo, por tanto, una pérdida del 75% de las plantas que son llevadas a las casas de cultivo.

Estas grandes pérdidas contribuyen a aumentar considerablemente el costo de producción por planta. Siendo una de las desventajas fundamentales que presenta esta técnica de cultivo.

El problema científico es que no existe un trabajo orientado a lograr una mejor adaptación de las plantas en la etapa III de la aclimatización manejando para ello las condiciones ambientales dentro de los frascos de cultivos para lograr una mejor adaptación de las mismas al ser llevadas a las casas de cultivo.

En este trabajo nos trazamos el siguiente **objetivo general**: Estudiar el comportamiento de las condiciones ambientales y sus efectos en la micropropagación de plantas. El mismo se realizó en el Centro de Bioplasmas situado en la Universidad de Ciego de Ávila y para ello se cumplieron los siguientes objetivos:

- Estudio del comportamiento de las variables ambientales sobre el crecimiento y desarrollo de plantas y comprender los mecanismos de la fotosíntesis, transpiración y respiración en ambiente *ex vitro*, *in vitro* y dentro de los biorreactores de inmersión temporal.
- Realización de un experimento que me permita evaluar el comportamiento de las plantas dentro de los biorreactores de inmersión temporal.
- Describir cómo influyen sobre la fotosíntesis, la transpiración y la respiración las variables ambientales.

- Analizar en los experimentos realizados dentro de los biorreactores de inmersión temporal, cual contribuyó a obtener una planta de mayor calidad.
- Comparar los niveles de realización de fotosíntesis de las plantas cultivadas en ambiente *in vitro* y dentro de los biorreactores de inmersión temporal.

Para cumplir estos objetivos se montó un biorreactor de inmersión temporal en el laboratorio de células y tejidos que radica en el Centro de Bioplantas. Se realizaron, además, experimentos variando las concentraciones de CO₂ y la densidad del flujo de fotones fotosintéticamente activo (FFF) (George, 1993) con que se iluminaron los cultivos obteniendo resultados muy satisfactorios en cuanto a porcentaje de plantas competentes.

Como hipótesis general de trabajo se plantea que una vez conocido los procesos más importantes relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas en ambiente *in vitro* y el efecto que las distintas variables ambientales producen sobre los mismos se pueden obtener un mayor porcentaje de plantas competentes lo que es sinónimo de un mayor porcentaje de supervivencia cuando las plantas son llevadas a las casas de cultivo.

Se pudo encontrar que hay varias variables ambientales que influyen en la fotosíntesis, respiración y transpiración aunque fundamentalmente hay tres que influyen sobre una mejor adaptación de plantas al medio *ex vitro*. Estas variables son la humedad relativa, la concentración de CO₂ y la FFF.

Este trabajo resulta muy novedoso porque sin la aplicación de los biorreactores de inmersión temporal se obtienen un 25% de plantas competentes con un 75% de plantas de muy baja calidad que están destinadas a morir en ambiente *ex vitro* (González, 2003). Se demuestra ahora que con la introducción de los biorreactores de inmersión temporal se logra más de un 80% de plantas competentes representando esto un aumento de la calidad de las vitroplantas y de la producción del Centro de Bioplantas.

La tesis está organizada en tres capítulos. En el primer capítulo se hace un estudio sobre la situación del tema en la actualidad y se adentra en el campo de la micropropagación. Además se tratan los fenómenos y procesos que ocurren en las plantas así como el efecto de las variables ambientales en los mismos. El segundo capítulo profundiza en las condiciones de cultivo *in vitro* y muestra el comportamiento de las condiciones ambientales y sus consecuencias sobre la fotosíntesis, la respiración y la transpiración de las plantas. Además se hace una explicación del experimento que se realiza y de los medios técnicos empleados

en el mismo. En el tercer capítulo se explican los resultados del experimento y de cómo se comportaron las condiciones ambientales y sus efectos sobre la fotosíntesis, la respiración y la transpiración.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN A LA MICROPROPAGACIÓN. LAS PLANTAS Y SU COMPORTAMIENTO EN AMBIENTE *EX VITRO*.

En este capítulo nos adentramos en el mundo de la micropropagación o del también llamado cultivo de células analizando sus ventajas y desventajas. Además se estudian los principales procesos que ocurren en las plantas y que más importancia tienen para el mantenimiento de la vida, así como el efecto que logran sobre los mismos, las condiciones ambientales. Para comprender estos procesos se hace una explicación de los fenómenos que ocurren en las plantas en general y los factores que influyen en ellos.

1.1 Situación del tema en la actualidad.

En los procedimientos de cultivo descritos hasta la década de los ochenta, no se hace ninguna referencia al control ambiental en el desarrollo de las plantas *in vitro*. Sin embargo, las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los frascos de cultivo. Junto a estas condiciones ambientales tenemos la composición del medio de cultivo el cual es fundamental para el comportamiento de las vitroplantas en su crecimiento.

La investigación y el desarrollo de tecnologías vinculadas al cultivo *in vitro* han sido guiada para resolver la contaminación en los frascos de cultivo, uno de los grandes problemas ligados a la micropropagación. Este problema se ha resuelto con la utilización de robot industriales, que actuando en las primeras etapas, logran mantener un medio aséptico por un mayor tiempo ya que evitan la acción del hombre. Para que haya un buen funcionamiento de la robótica es muy importante el desarrollo alcanzado en el tratamiento de imágenes ya que el robot es el encargado de realizar cortes y trasplantes con completa autonomía (Cassells, 1991; Cazzulino y col., 1991; Fujita y Kinase, 1991; Gupta y col., 1991).

Es a partir de finales de la década de los ochenta y hasta la actualidad que se han realizado investigaciones con vista a describir el impacto de las condiciones físicas, químicas,

gaseosas y del medio de cultivo en el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas pero con muy poco aprovechamiento de estos avances científicos.

Se han hecho estudios sobre la temperatura, la influencia de la luz teniendo en cuenta la FFF, ciclos de iluminación, distribución del espectro de iluminación y la dirección de incidencia de los rayos de luz, la composición gaseosa teniendo en cuenta las concentraciones de CO_2 , O_2 , C_2H_4 , la humedad relativa, el flujo de aire, la presión y el potencial hídrico. También se sabe de la importancia de la composición orgánica e inorgánica como azúcares, reguladores del crecimiento, reguladores del potencial osmótico, pH, O_2 y CO_2 disueltos y microorganismos del medio de cultivo (Kirdmanee y col., 1994; Kirdmanee y col., 1995; Kitaya y col., 1998).

1.2 La micropropagación, una técnica para el cultivo de plantas.

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo (Aceves y Hernández, 1997).

La Micropropagación es una biotecnología que se aplica a especies vegetales con el fin de obtener una población en el menor período de tiempo posible. Muchas veces es sinónimo de cultivo de tejidos.

1.2.1 Funcionamiento de una biofábrica y las etapas de la micropropagación.

La producción de plántulas a través del cultivo de tejidos es mostrado en la fig. 1.1

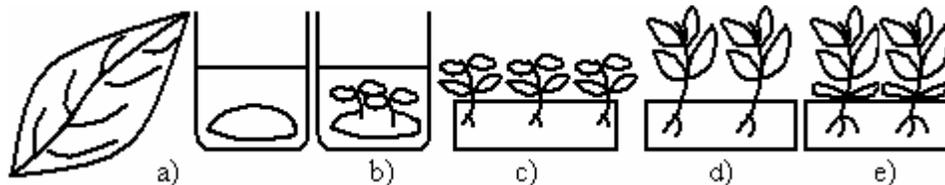


Fig. 1.1 Proceso de producción de plántulas. a) Etapa 0: Toma de explantes b) Etapa I: Implantación c) Etapa II: Multiplicación d) Etapa III: Enraizamiento e) Etapa IV: Aclimatización.

Primeramente se selecciona la planta madre la cual debe ser sana y poseer características variables conformes con la variedad elegida (Castro y González, 2000). De ella se toma un explante, el cual puede ser una pequeña porción de células en división, yemas laterales o preferentemente yemas apilares. Luego es colocado en un medio de cultivo para inducir y desarrollar yemas axilares o callos. Cuando los callos son formados, brotes adventicios pueden ser inducidas agregando apropiados reguladores del crecimiento. Los brotes formados *in vitro* son transferidos a otros medios para obtener plantas con raíces. Para una rápida multiplicación los brotes son divididos y retrasplantados en el medio inicial, el cual permite desarrollo de brotes adventicios. Este procedimiento se puede repetir hasta obtener millones de plantas.

Durante la división de plántulas es necesario que cada porción tenga más de un nodo. De cada nodo saldrá un nuevo brote, el cual a su vez puede desarrollar y convertirse en un retoño.

El proceso de la micropropagación esta dividido en cinco etapas desde el punto de vista biológico. Hay tres etapas que ocurren *in vitro* mientras que una cuarta etapa ocurre *ex vitro* en una casa de cultivo. Posteriormente se añadió una etapa llamada cero considerada *ex vitro* (Kurtz y col., 1991a).

Estas etapas son:

•**Etapa 0:** Toma de explantes (*ex vitro*). Se toma una pequeña porción de planta la cual puede ser de yemas laterales o yemas apilares y es colocada en un medio de cultivo para inducir y desarrollar yemas axilares o callos. Las yemas apilares son las más usadas como explantes primarios en la micropropagación porque ellas están libres de virus debido a que todavía son muy jóvenes. Siempre se trata de tener la menor contaminación posible en los explantes ya que si existiera contaminación y esta se mantuviera en etapas posteriores al agregar un medio de cultivo rico en glucosas y sacarosas se tendría que abandonar el cultivo y volver a comenzar porque se aceleraría la reproducción de las bacterias contaminantes. La contaminación es un factor importantísimo desde el principio por ello las plantas madres son cultivadas en casas de cultivo libres de bacterias, virus y fungi patógenos lográndose desarrollar varios métodos para detectar la presencia de los mismos.

•**Etapa I:** Implantación (*in vitro*). Se comienza y establece el cultivo en un medio aséptico. Los callos son formados y se inducen brotes agregando apropiados reguladores del

crecimiento. Cualquier presencia de contaminación debe ser detectada en esta etapa para prevenir grandes pérdidas en etapas posteriores de la micropropagación. Para llevar a cabo la descontaminación existen distintos métodos como aplicar calor o quimioterapia. El método más económico es evitar la contaminación y por eso se procede a cultivar la planta madre en un ambiente lo más libre de contaminación posible. Esta etapa dura aproximadamente de tres a veinticuatro meses con al menos cuatro subcultivos.

•**Etapa II:** Multiplicación (*in vitro*). Durante la etapa II los brotes y nodos son divididos y trasplantados en el medio inicial permitiendo el desarrollo de nuevos brotes, cada porción debe tener más de un nodo. En esta etapa es cuando se aprecian cambios en los signos morfológicos de los explantes y se aumentan las concentraciones de las hormonas en el medio de cultivo para lograr una micropropagación acelerada. Esta etapa puede durar entre diez y treinta y seis meses dependiendo de que no se perciban grandes cambios en los cultivos.

•**Etapa III:** Enraizamiento (*in vitro*). Se induce la formación de raíces y en algunas especies la elongación, donde plántulas pequeñas alcanzan mayor tamaño. Después de realizada la multiplicación tenemos una gran aglomeración de brotes los cuales serán inducidos a producir raíces *in vitro*, necesitando de otro subcultivo. Para algunos cultivos esta etapa se puede llevar a cabo en las casas de cultivo. Esta etapa, generalmente requiere de una a seis semanas.

•**Etapa IV:** Aclimatización (*ex vitro*). Es la adaptación a nuevas condiciones climáticas de una plántula, la cual es movida a un nuevo ambiente. Este proceso siempre tiene lugar bajo la guía activa del ser humano. En este momento la plántula ya está lista para ser llevada a una casa de cultivo donde se han desarrollado varias técnicas para llevar a cabo este proceso. Podemos citar llevar a cabo la aclimatización en una habitación con condiciones ambientales controladas, incubadoras cubiertas de plástico en las casas de cultivo o mantener una niebla en toda la casa de cultivo. Las plántulas son transplantadas manualmente en la casa de cultivo (Kurtz y col., 1991b; Sagawa y Kunisaki, 1990a).

1.2.2 Las ventajas y desventajas de la micropropagación.

Por la vía de la agricultura tradicional se tiene el inconveniente de que el cultivo de plantas es muy lento. Además para una mayor multiplicación es necesario un mayor espacio. Otras

dificultades son plagas, enfermedades y fenómenos climatológicos que pueden llegar a diezmar la población de plantas (González, 2004a)

Ante estos problemas surge la necesidad de recurrir al cultivo *in vitro*. A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc.

No todo es perfecto, como resultado del ambiente *in vitro*, las plantas desarrollan una anatomía y fisiología diferente a la de las plantas cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo. Los desórdenes afectan todos los órganos de la planta aunque no todos tienen el mismo peso sobre el comportamiento *ex vitro*.

Algunos de estos desórdenes se enumeran a continuación:

- Por la alta humedad relativa en los frascos, las plántulas no necesitan restringir el intercambio de gases trayendo como consecuencia el retraso en el crecimiento de la cutícula y de las ceras epicuticulares.
- Estomas redondos en lugar de ser 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.
- Presencia de cloroplastos achatados y desprovistos de almidón en algunas especies.
- El contenido de clorofila es variable y depende de la FFF. En general las plántulas presentan un contenido total de clorofila semejante al de las plantas *ex vitro* bajo similares FFF, pero debido a la poca funcionalidad de las mismas al ser llevada las plántulas a condiciones *ex vitro* solo muy pocas realizan su función biológica.
- Existe carencia de tejidos vascular funcional, con pobre conexión entre el tallo y el sistema radical lo que frecuentemente restringe la toma de agua. Las raíces contienen granos de almidón, abundantes espacios intercelulares y son generalmente hipertróficas con una longitud muy grande y tejido vascular primario; mientras que las células de las raíces *ex vitro* presentan células más uniformes y compactas, con tejidos vasculares primarios y secundarios.

- A causa de la hiperhidratación se producen desórdenes morfológicos y un crecimiento distorsionado. Se afecta además la fotosíntesis, la transpiración y el intercambio de CO₂ y O₂, procesos de gran importancia para la calidad y supervivencia de las vitroplantas.
- Las plantas realizan escasa fotosíntesis producto de la baja concentración de CO₂ durante la incidencia de la luz en los frascos de cultivo cerrados.
- Escaso transporte de nutrientes y de agua debido a la gran humedad relativa en los frascos de cultivo (Sagawa y Kunisaki, 1990b).

A pesar de estos inconvenientes la micropropagación es una forma viable para dar solución a las necesidades actuales. Se trabaja en lograr que las plántulas tengan un comportamiento lo más semejantes al de las plantas cultivadas en el campo o casas de cultivo. Para ello se incluye una etapa de aclimatización *ex vitro* donde la plántula realiza un proceso de adaptación a las condiciones imperantes en el campo como son los niveles de concentración de CO₂, porcentaje de humedad, temperatura y la FFF, factores ambientales que más afectan la supervivencia y la fotosíntesis neta de las plantas junto a la deshidratación debida a la pérdida de agua foliar y restringida toma de agua por las raíces.

Mientras las plántulas cultivadas tienen mayor calidad, mejor será su adaptación y por tanto mayor será el porcentaje de supervivencia. Las plantas micropropagadas al ser llevadas a la etapa de aclimatización, presentan en las primeras semanas una supresión de la fotosíntesis, fotoautotrofia incompleta y tasas de crecimiento negativas, excesiva transpiración producto de la dificultad en la toma de agua y de nutrientes llegando a producirse un retado en el crecimiento o la muerte de las plantas. La necesidad de una etapa de adaptación larga es otro de los inconvenientes que presenta el cultivo *in vitro*. Este proceso de adaptación se puede adelantar en la etapa de enraizamiento si se logra alcanzar a niveles de laboratorio las condiciones ambientales lo más parecida a las de una casa de cultivo.

Este trabajo muestra una explicación del comportamiento de cada variable en el proceso de la micropropagación y entra en el campo de los birreactores de inmersión temporal, dando una explicación detallada del comportamiento de estas variables particularmente en el cultivo de *Eucalyptus Urograndis* (E. Grandis Hill ex Maiden x E. urophylla).

1.3 El comportamiento de las plantas en ambiente *ex vitro*.

En este epígrafe son tratados los fenómenos de ósmosis, difusión en los gases y los solutos, el potencial hídrico, así como una explicación detallada del proceso de la fotosíntesis, transpiración y respiración en las plantas en ambiente *ex vitro* (Vázquez y Torres, 1981).

1.3.1 Las relaciones hídricas de las células.

Para interpretar las relaciones hídricas de las células y los tejidos vegetales, es necesario conocer la dinámica de este proceso y el significado de la difusión y de la osmosis.

1.3.1.1 La difusión.

El CO₂ y el O₂ penetra a las plantas por los estomas, y el agua, los cationes y los aniones de las sales inorgánicas pasan desde el suelo a través de las raíces. Las sustancias procedentes del medio, no solo penetran en la planta sino que también salen al exterior. En las hojas y otros órganos aéreos se desprenden grandes cantidades de vapor de agua hacia la atmósfera y bajo ciertas condiciones se produce desprendimiento de CO₂ y O₂ que pasan de la planta a la atmósfera. Todo este movimiento es en parte debido al proceso de la difusión.

1.3.1.2 La difusión de los gases.

Todos estamos familiarizados con la dispersión de los gases. Ejemplo es en un local cerrado abrimos un frasco de perfume en poco tiempo podemos sentir el olor característico en todo el local. Tal dispersión molecular se debe en parte a la difusión aunque en este caso intervienen también las corrientes de aire.

1.3.1.3 Los factores que influyen en la difusión de los gases.

Los factores que influyen en la difusión de los gases son:

- a) Densidad del gas.** La velocidad relativa de difusión de diferentes gases es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de sus densidades relativas. Se entiende como densidad relativa al peso de un volumen determinado de gas, comparado con el peso de igual volumen de hidrógeno. Ejemplo el hidrógeno difundirá cuatro veces más rápido que el oxígeno.
- b) Temperatura.** Aumento de la temperatura incrementará la velocidad de difusión lo que se debe en parte al aumento de la actividad cinética de las moléculas de las sustancias.
- c) Gradiente de difusión.** En general cuanto mayor es la diferencia de presión de difusión entre dos regiones, con más rapidez se realiza la difusión. Sin embargo, en su velocidad no

influyen solamente las diferencias de las presiones de difusión, sino también la distancia que deben atravesar las moléculas al difundirse. Estos dos factores son componentes de lo que pudiera llamarse gradiente de presión de difusión.

d) Concentración del medio en el cual se produce la difusión. Cuando más concentrado esté el medio, es decir, cuanto mayor sea el número de moléculas por unidad de volumen que hay en el medio en el cual se deben desplazar las moléculas en difusión, más lenta será la velocidad de difusión.

1.3.1.4 La difusión de los solutos.

La disolución de moléculas de solutos en líquidos ocurre producto de la difusión de estos solutos en el medio líquido.

1.3.1.5 Los factores que influyen en la difusión de los solutos.

Los factores que influyen en la difusión de los solutos son:

a) Temperatura. Al igual que en los gases, aumentos de la temperatura determinan incrementos en la velocidad de difusión, lo que se debe al aumento de la actividad cinética de las moléculas de las sustancias de difusión.

b) Gradiente de presión de difusión. En general cuanto mayor es la diferencia de presión de difusión entre dos regiones, con más rapidez se realiza la difusión. Sin embargo, en su velocidad no influyen solamente las diferencias de las presiones de difusión, sino también la distancia que deben atravesar las moléculas al difundirse. Estos dos factores son componentes del gradiente de presión de difusión. La velocidad de difusión es directamente proporcional a las diferencias de presiones de difusión y inversamente proporcional a la longitud de las distancias de difusión.

c) Concentración del medio en el cual se produce la difusión. Cuando más concentrado esté el medio, es decir, cuanto mayor sea el número de moléculas en difusión, más lenta será la velocidad de difusión.

d) Tamaño y masa de la partícula de difusión. Las moléculas pequeñas o los iones difunden más rápido que las de mayor tamaño. Por ejemplo un ion hidrógeno difunde más rápido que una molécula de glucosa. También la masa de las partículas influye. Una partícula de mayor masa difunde más lentamente que una partícula de menor masa.

e) Solubilidad. Cuando más soluble sea una sustancia en un líquido, con más rapidez difundirá a través de él.

1.3.1.6 La difusión de los líquidos. La ósmosis.

Cuando hablamos de ósmosis nos referimos al movimiento de un solvente que va de una región de mayor presión de difusión a la otra de menor presión de difusión de las moléculas del solvente, o también podemos referirnos al movimiento del agua de una zona de menor concentración de solutos osmóticos a otra zona de mayor concentración de solutos osmóticos. Se entiende por solutos osmóticos aquellas sustancias que presentan afección por el agua y son solubles en ella. La ósmosis es muy parecida a la difusión, y el único factor que la diferencia es la presencia de una membrana semipermeable.

La ósmosis tiene gran importancia para las plantas y no puede ser subestimado. El agua se mueve hacia el interior de las células y dentro de ella hacia los diferentes orgánulos mediante ósmosis.

1.3.1.7 El potencial hídrico.

El potencial hídrico o acuático es la fuerza con que un cuerpo es capaz de absorber agua del ambiente. Está representado por la suma de todas las fuerzas que son capaces de atraer agua al interior de las células. El potencial hídrico sirve para indicar el estado de turgencia de las células. Un valor bajo (valor absoluto) del potencial hídrico nos indica que la planta ya ha tomado agua en gran medida y le queda poca fuerza para succionar más agua. A medida que la célula está más turgente (más llena de agua), menor será la posibilidad de tomar agua. Mientras que si el valor del potencial hídrico está muy alto (valor absoluto), nos indica que la célula está vacía y tiene gran fuerza para tomar agua. Así el potencial hídrico nos muestra el déficit de agua o tensión (stress) en las células de las plantas y sus tejidos.

Se considera que el potencial hídrico es un valor por debajo de cero para la mayoría de las plantas y debe estar representado por un número negativo, que significa succión o tensión. Un potencial hídrico positivo puede ser producto de alta humedad del suelo y transpiración nula.

El potencial hídrico de las hojas varía durante el día. Alcanza su valor máximo en horas avanzadas de la tarde por efecto de la pérdida de agua producto de la transpiración y la acumulación de solutos por la fotosíntesis. El mínimo valor se presenta en horas de la mañana (madrugada) cuando la absorción de agua sobrepasa las pérdidas por transpiración y se reducen los solutos osmóticos por circulación y consumo.

1.3.1.8 Los factores que afectan el potencial hídrico.

Los factores que afectan el potencial hídrico son:

a) Temperatura. La temperatura incrementa el potencial hídrico al aumentar la capacidad de las sustancias osmóticas y los coloides para atraer agua. El potencial hídrico de una planta aumenta con el aumento de la temperatura. Indirectamente la temperatura afecta la pérdida de agua por la transpiración y la absorción de agua por las raíces.

b) Concentración de solutos osmóticos y coloides absorbentes. El tipo y la cantidad de sustancias no acuosas en un sistema ejercen considerable efecto en el potencial hídrico de este. De la cantidad de azúcares, sales minerales, ácidos orgánicos y compuestos coloidales de las células dependerá la fuerza de succión (potencial hídrico). La concentración de solutos osmóticos depende de la intensidad de la fotosíntesis y del gasto que se realiza en el proceso de crecimiento, así como la absorción de sales minerales por las raíces.

c) Disponibilidad de agua. A mayor contenido de agua en las células, menor será el potencial hídrico. La variación de este contenido es producto de la transpiración y la toma de agua por las raíces. Si la planta pierde agua se reduce el contenido acuoso en las células y el potencial hídrico aumenta. De igual forma una escasez de agua en el suelo incrementa directamente el potencial hídrico del suelo e indirectamente el de la planta.

1.3.1.9 Los estomas.

La superficie de las hojas presenta un número considerable de pequeñísimos poros microscópicos denominados estomas. Los estomas sirven de vías para el intercambio gaseoso entre los espacios intercelulares de las hojas y la atmósfera que las rodea. Estos pequeños poros se encuentran unas veces abiertos y otras veces cerrados. La cantidad de estomas por hoja puede variar por especie como se muestra en la tabla 1.1. A pesar de la gran cantidad de estomas son tan pequeños que incluso abiertos ocuparían el 1 o 2% del área de la hoja total.

Tabla 1.1 Distribución promedio de los estomas en las hojas de varias especies.

Especies	Estomas / cm ²	
	Haz	Envés
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	1200	13000
Plátano (<i>Musa Paradisiaca</i>)	0	27300

1.3.1.10 Los factores que afectan el movimiento de los estomas.

La apertura y cierre de los estomas esta vinculado con el contenido osmótico de las células oclusivas. Por otra parte, la variación del contenido osmótico de las células oclusivas depende en gran medida de la influencia de algunos factores externos entre los que se encuentran:

a) Luz. En general se mantienen abiertos cuando están expuestos a la luz a menos que otros factores pasen a ser limitantes. En medio oscuro permanecen cerrados. La FFF necesaria para que los mismos se abran es muy inferior a la que necesita para la realización adecuada de la fotosíntesis.

b) Déficit de agua. Regularmente en las horas del mediodía de las regiones tropicales y en el Ecuador, la velocidad de transpiración supera a la velocidad de absorción de agua en la planta. Esto provoca una disminución de la turgencia de las células provocando el cierre de los estomas.

c) Concentración de CO₂. La presencia de CO₂ en la cámara subestomática es uno de los factores que determinan la apertura y cierre de los estomas. Estos se encontraran cerrados si la concentración de CO₂ dentro de la cámara subestomática es igual a la que existe en la atmósfera. Si disminuye la concentración de CO₂ traería como consecuencia la rápida apertura de los estomas y un aumento de la misma provocará un cierre de dichos poros. Es posible tener abierto los estomas incluso en condiciones de oscuridad y solamente con reducir la concentración de CO₂ en la atmósfera. Igualmente en condiciones de buena FFF los estomas se cerrarán si ocurre un aumento de la concentración de CO₂.

d) Temperatura. Temperaturas excesivamente altas y excesivamente bajas tienden a provocar el cierre de los estomas.

1.3.2 Los procesos internos de las plantas (fotosíntesis, respiración y la transpiración)

La fotosíntesis, la transpiración y la respiración son tres procesos importantes que contribuyen al crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. Es indispensable, para lograr una buena adaptación de las plantas, cuando son llevadas a las casas de cultivo (de la etapa III a la etapa IV) lograr tener controlados estos procesos. Ellos son

dependientes del ambiente cercano a las plantas. Por lo tanto, estos elementos son importantes para optimizar la productividad con un mínimo uso de energía.

1.3.2.1 La fotosíntesis.

A la propiedad de las plantas de asimilar CO_2 atmosférico y convertir la energía luminosa en energía química se le denomina fotosíntesis. Este es el proceso que más influye en la supervivencia de las plantas de hoy su importancia.

Los elementos necesarios para llevar a cabo la fotosíntesis son: luz, clorofila de las plantas, CO_2 atmosférico, algunos elementos minerales y agua. Los productos finales del proceso son los carbohidratos, que se utilizan posteriormente en la síntesis de las demás sustancias orgánicas, o como combustible para la respiración.

Para la síntesis de los carbohidratos se gasta energía en forma de ATP (trifosfato de adenosina), compuesto que se forma en el proceso de la fotosíntesis como consecuencia de la energía liberada por los electrones de la clorofila excitados por la luz en su retorno a los niveles energéticos correspondientes. Este complejo proceso se lleva a cabo en los cloroplastos, donde la energía radiante es convertida en energía química (fase luminosa) y el CO_2 es reducido para formar carbohidratos (fase oscura).

La fotosíntesis es un proceso mediante el cual el CO_2 atmosférico se transforma en materia orgánica con la participación de la energía aportada por un fotón de luz a la clorofila, y que se lleva a cabo en la unidad fotosintética o cuantosoma.

El proceso de la fotosíntesis tiene dos fases fundamentales. La fase luminosa y la llamada convencionalmente oscura. En la primera se absorbe energía luminosa y tiene como productos finales el ATP y el NADPH_2 , y en la segunda se fija el CO_2 atmosférico, con la participación de los productos finales de la primera fase, para producir carbohidratos.

En la fase luminosa ocurren dos series de reacciones principales: la fotorreacción I y la fotorreacción II.

La fotofosforilación cíclica (fotorreacción I) propicia el salto de los electrones de la clorofila activada, que en su retorno al lugar de origen ceden la energía para formar ATP.

La fotofosforilación acíclica (fotorreacción I y II) propician que los electrones de la clorofila activada y los protones procedentes de la fotólisis del agua puedan llegar hasta la formación del NADPH_2 sin retornar a su punto de origen, pero con saltos energéticos suficientes como para producir ATP.

Cuando la planta presenta escasez de CO_2 o de agua, solo realiza la fotofosforilación cíclica y acumula la energía en forma de ATP para procesos de síntesis posteriores.

Para que se realice la fotofosforilación acíclica se requiere la presencia de CO_2 y que ocurra normalmente el ciclo de Calvin (C3); de lo contrario el NADPH_2 permanece en su estado reducido y no acepta electrones.

La fotosíntesis esta muy influida por varios factores ambientales, algunos de los cuales forman parte directamente del proceso, como son el CO_2 atmosférico, la luz, la nutrición mineral, la temperatura entre otros.

Cuando ocurre la fotofosforilación cíclica se produce solamente la fotorreacción I, en la cual trabaja la clorofila a y el centro reactivo P-700. Gracias a la energía de los fotones, los electrones son expulsados de la clorofila a y llegan hasta un potencial de -430 mV aproximadamente, es decir, a un nivel energético de casi 900 mV.

Los electrones que salen expulsados de la clorofila a son interceptados por un sistema redox: la ferredoxina (FD), un fuerte reductor con un potencial normal de -432mV.

Desde la FD los electrones pueden ser trasladados a un componente intermedio, el FAD, pero si este se encuentra reducido (FADH_2) no acepta los electrones y en este caso (fotorreacción I) son transferido a la vitamina K o al flavinmononucleótido (FMN). Si han sido captados por la vitamina K, son cedidos al citocromo f de este a la plastocianina (PC) y de esta al P-700. Si han sido captados por el FMN, primero son transferidos al citocromo b₆ de este al f, y así de igual manera hasta la PC que tiene un potencial energético casi igual al P-700, al que cede todos los electrones rápidamente. De esta manera, se construye de nuevo la estructura normal de la clorofila y los electrones vuelven a su lugar de origen.

En la fotorreacción I se produce ATP en el salto de los electrones de la vitamina K al citocromo f, y en el salto del citocromo b₆ al citocromo f, por lo cual este recorrido cíclico del electrón con producción de ATP se le ha denominado fosforilación cíclica.

En ninguna de las dos vías seguidas por el electrón, ya sea la de la vitamina K o la del FMN, se necesita descomponer agua. No se producen protones ni tampoco se libera oxígeno molecular.

La fosforilación cíclica es un proceso independiente, vinculado únicamente a la fotorreacción I. Solo se produce ATP en los cloroplastos con aprovechamiento de la energía solar. No necesita agua ni tampoco requiere de la participación del CO_2 atmosférico. Esto

quiere decir que las plantas verdes pueden producir ATP como unidades de energía química transportables, también en condiciones de escasez de agua o de CO₂ (cierre de los estomas). El ATP producido de esta manera se puede aprovechar para otro proceso de síntesis metabólica.

En la fotorreacción II intervienen los pigmentos de la periferia de la unidad fotosintética (pigmentos II) donde participan las clorofilas a y b, junto con los aportes de los carotenoides. La fotorreacción II comienza con la fotólisis del agua, que se origina por la atracción que ejerce la clorofila activada (oxidada) sobre la molécula de agua a causa del choque con los fotones de la luz.

Al igual que en la fotorreacción I, la energía de los fotones expulsa electrones de la estructura de la clorofila y deja una carencia de cargas negativas, es decir, un exceso de cargas positivas. Para remplazar los electrones perdidos de la clorofila, se extraen electrones del agua, la cual está siempre presente en los cloroplastos funcionales. Esta atracción hace descomponer la estructura molecular del agua y da lugar a la liberación de protones y de oxígeno molecular. El oxígeno molecular proviene de la descomposición del agua y en este proceso juega un papel fundamental el manganeso como centro activo de una enzima que participa en dicho proceso.

A nivel de agua molecular los electrones tienen un potencial energético de +810 mV, aproximadamente. La energía de los fotones les agrega un potencial de -800 mV. De esta forma, los electrones expulsados de la clorofila de la fotorreacción II llegan a un potencial de 0 mV aproximadamente, donde son interceptados por las plastoquinonas (PQ).

Las PQ son hidrogenasas del tipo de las quinonas, es decir necesitan electrones y protones para su reducción; es por eso que se interceptan, como paso transitorio, los electrones del agua en este sistema redox. Tienen un potencial de 0 mV. Desde las PQ los electrones se trasladan sin los protones hacia el centro reactivo de la fotorreacción I (P-700). Este traslado se realiza a través de varios compuestos intermedios: el citocromo b₆, con un potencial aproximado al nivel de las PQ; el citocromo f, con un potencial mucho más bajo, cerca del nivel energético del P-700 y la PC con un potencial casi igual al P-700.

Desde la PC, los electrones pasan a la clorofila de las unidades fotosintéticas, y de esta manera se reconstruye la estructura normal de la clorofila, la que puede entrar de nuevo en la fotorreacción I.

Los protones procedentes de la fotorreacción II son interceptados finalmente por el FAD, junto con los electrones procedentes de la fotorreacción I. desde el FAD, el hidrógeno se traslada al NADP y lo reduce a NADPH_2 , que se puede utilizar como portador de energía química en cualquier reducción metabólica. La acción coordinadora de las dos fotorreacciones no solamente libera protones como fuente de energía química, sino que también da lugar a la formación de ATP durante el traslado de los electrones desde el sistema de fotorreacción II al sistema I, aprovechando el gradiente energético entre los potenciales redox de las PQ y las PC. La PQ se encuentra a un potencial de 0 mV, mientras que el P-700 tiene un potencial de +400 mV, es decir, que entre los 2 sistemas redox existe un gradiente de -400 mV, o sea, un $\Delta G = -19$ kcal/mol.

Considerando que la formación de ATP desde ADP y fosfato inorgánico consume unas 8kcal/mol, se puede aprovechar el gradiente energético mencionado arriba para formar, por lo menos, una molécula de ATP por cada electrón que pasa por esta trampa energética. Este tipo de fotofosforilación se llama acíclico porque exige un flujo continuo de electrones desde el agua, a través de las dos fotorreacciones, hasta la FD y de esta al NADP.

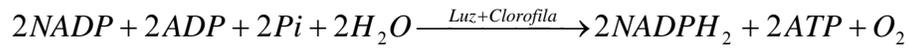
Ahora bien, cuando los electrones de la fotorreacción I no son interceptados por el NADP, por encontrarse este totalmente reducido o cuando no hay suministro de electrones desde la fotorreacción I, se efectúa solamente la fotorreacción I. Generalmente ambas reacciones pueden ocurrir a la vez. En la fig. 1.2 podemos ver el esquema completo de las fotofosforilación.

Teóricamente se necesita un fotón para expulsar un electrón, o sea, 4 fotones para liberar una molécula de oxígeno. Pero los 4 electrones liberados solamente se utilizan para remplazar otros 4 electrones expulsados por fotones durante la fotorreacción I. Es por ello que se necesitan aproximadamente 8 fotones en total para liberar una molécula de oxígeno como producto de las fotorreacciones I y II. Además, se producen 4 protones como unidades de energía química, los cuales dan lugar a la reducción del NADP y a la formación de 2 complejos de NADPH_2 .

Además de la formación de NADPH_2 se aprovecha el gradiente energético entre los potenciales de la PQ (0 mV) y el P-700 (+400 mV) para producir ATP.

Sin tener en cuenta las sustancias intermedias de las fotofosforilaciones, el balance total será:

Fotofosforilación acíclica:



Fotofosforilación cíclica:

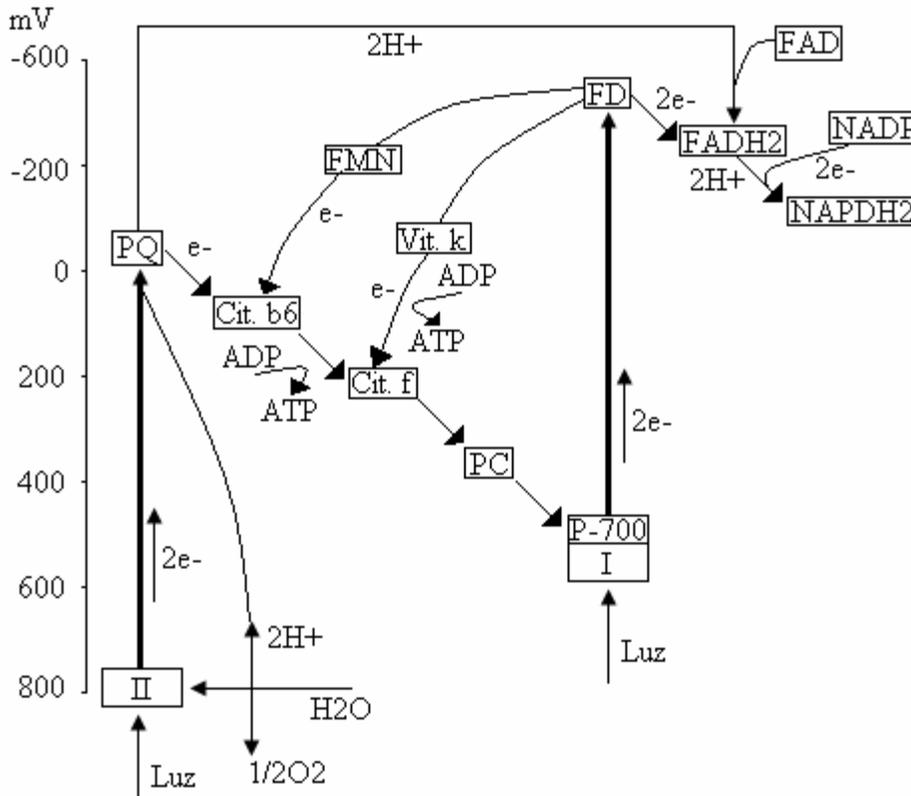
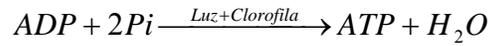


Fig. 1.2 Esquema completo de la fotofosforilación.

El resultado de las fotorreacciones I y II, analizadas anteriormente, es la producción de energía química utilizable en forma de ATP y de NADPH₂, compuestos ambos que podemos considerar que son la premisa fundamental para que el CO₂ atmosférico pueda quedar fijado en forma de compuestos orgánicos carbonados, esencialmente azúcares (hexosas). El ATP y NADPH₂ son la llamada energía de asimilación, sin la cual no es posible la conversión del CO₂ (sustancia inorgánica) en compuestos orgánicos.

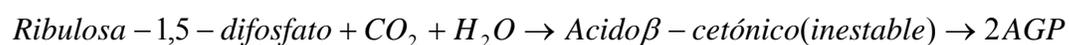
A partir del CO₂ atmosférico, con la ayuda de la energía de asimilación, se produce una molécula compleja de seis átomos de carbonos (azúcar simple). Estos procesos químicos para los cuales se invierte energía se denominan reducciones. Por ello, a la fijación de CO₂ se le debe llamar reducción de CO₂.

La reacción del CO₂ en el proceso fotosintético no es una reacción sencilla entre dos compuestos químicos, sino que se realiza mediante un complicado sistema de muchos pasos individuales en forma de una cadena cíclica, en la cual participan, por lo menos, unas 15 reacciones particulares. Esa vía seguida por el CO₂ en su reducción fue propuesta por Calvin hace 50 años aproximadamente. Este investigador dejó bien esclarecido el proceso cíclico que sufre el CO₂ en las algas y las plantas verdes, el cual ha sido comprobado ya en todos los vegetales terrestres. Dicho proceso se denomina ciclo de Calvin o ciclo de fijación del CO₂.

Esta parte del proceso fotosintético, o sea, la transformación del CO₂ en hidratos de carbonos, es puramente bioquímica y no requiere la luz directamente, se trata de una reacción oscura. El hecho de que solo se produzca durante las horas de luz solar, se debe a que requiere de la energía de asimilación (ATP y NADPH₂) producida en la fase luminosa y de ahí que ambas fases, la luminosa y la oscura, se produzcan simultáneamente durante el día.

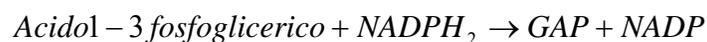
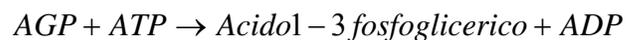
El ciclo de Calvin se puede dividir para su estudio en cuatro fases fundamentales: carboxilación, reducción, síntesis de hexosas primarias y regeneración de la ribulosa difosfato.

En la carboxilación, como aceptor del CO₂ actúa un azúcar de 5 átomos de carbono, la ribulosa-1,5-difosfato y el producto inmediato de la reacción es un ácido β-cetónico inestable, que se desdobra rápidamente en dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (AGP).



El ácido 3-fosfoglicérico formado cuenta con 3 átomos de carbono y es una sustancia oxidada de bajo nivel energético.

En la reducción, a continuación el ácido 3-fosfoglicérico se reduce a una triosa difosfatada para lo cual se requiere ATP y NADPH₂. Esta reacción en la que el grupo carboxilo del ácido 3-fosfoglicérico se reduce a un grupo carbonilo (grupo funcional del aldehído) y ocurre como en la reacción siguiente.



Al contrario del ácido 3-fosfoglicérico, el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) es una sustancia reducida de alto nivel energético y representa el punto de partida para toda las demás reacciones de síntesis.

Después ocurre la síntesis de hexosas primarias donde el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) se transforma, en parte, en dihidroxiacetona-fosfato y la unión de ambas triosas conduce a la formación de fructuosa-1,6-difosfato, que es la primera hexosa que aparece en el proceso de asimilación de CO₂.



Y por último la ribulosa difosfato, que sirve de aceptor de CO₂, tiene que generarse, pues de lo contrario la reacción se detendría rápidamente. La trayectoria seguida para la generación de la ribulosa es similar a la hexosas en el ciclo de la pectosa-fosfato, pero en dirección opuesta.

En este trabajo solo hablamos de plantas que realizan solamente el ciclo de Calvin o C3 las cuales representan el 92% de las plantas existentes en el mundo y además las plantas *in vitro* tienen una tendencia comportarse como si fueran C3 (González, 2004b).

La fórmula global del proceso de la fotosíntesis se puede resumir:



1.3.2.2 Los factores que influyen en la actividad fotosintética.

La fotosíntesis, al igual que otros procesos biológicos, esta sometida a las condiciones del ambiente. Dicho proceso solo se realiza entre determinados intervalos de temperatura, de iluminación, de humedad y de concentración de CO₂. La parte bioquímica de este proceso solo puede realizarse dentro de los límites que permitan el trabajo de las enzimas, mientras que la parte física está en dependencia también de los límites en que se produce este trabajo enzimático, pues no podemos separar ambas partes de este sistema, ya que una influye en la otra. De acuerdo con lo planteado, cada factor relacionado con la fotosíntesis existirá en la categoría de mínimo, óptimo y máximo, es decir, que habrá una temperatura mínima donde la fotosíntesis se realice, una temperatura óptima donde será máxima la actividad fotosintética y una temperatura máxima, por encima de la cual no se producirá la fotosíntesis. De igual manera ocurrirá con la luz y la concentración de CO₂.

Cuando los factores del ambiente interrumpen la fotosíntesis por encima de un máximo o por debajo de un mínimo, se les llama factores limitantes.

Los factores que influyen sobre la fotosíntesis no pueden ser estudiados por separado puesto que la influencia de uno estará en dependencia de las condiciones en que se encuentren los otros factores. Si los demás factores se mantenían constantes, el factor fluctuante influiría sobre la actividad fotosintética, desde un mínimo (por debajo de la cual no ocurre la fotosíntesis) hasta un óptimo, más allá del cual no aumenta la fotosíntesis, si no que se mantiene constante. A partir de este momento son otros factores los que actuarán como limitantes del proceso fotosintético. Si alguno de los factores aumenta en cantidad, la actividad fotosintética aumentará produciéndose otro óptimo para el primer factor y este óptimo continuará hasta que otro factor se haga limitante.

a) Luz. La luz influye en la fotosíntesis desde tres puntos de vista: calidad, duración y FFF.

Calidad. Se ha observado que la fotosíntesis es más activa cuando se ilumina la planta con longitudes de onda entre 400 y 700 nm. Cuando estudiamos el espectro de absorción de los pigmentos que intervienen en el proceso de la fotosíntesis vemos que cada uno tiene su propio espectro de absorción. La mayoría de los pigmentos no absorbe en mayor cuantía la longitud de onda verde por lo que la hoja presenta su color característico. Si observamos la figura del espectro de absorción de algunos pigmentos fotosintéticos vemos que, independientemente que se refleje el verde este es absorbido por algunos pigmentos, por lo que se llega a la conclusión de que es necesario para la realización del proceso fotosintético en condiciones óptimas, una iluminación con luz blanca.

En la fig. 1.3 se muestra el espectro de absorción de algunos pigmentos fotosintéticos.

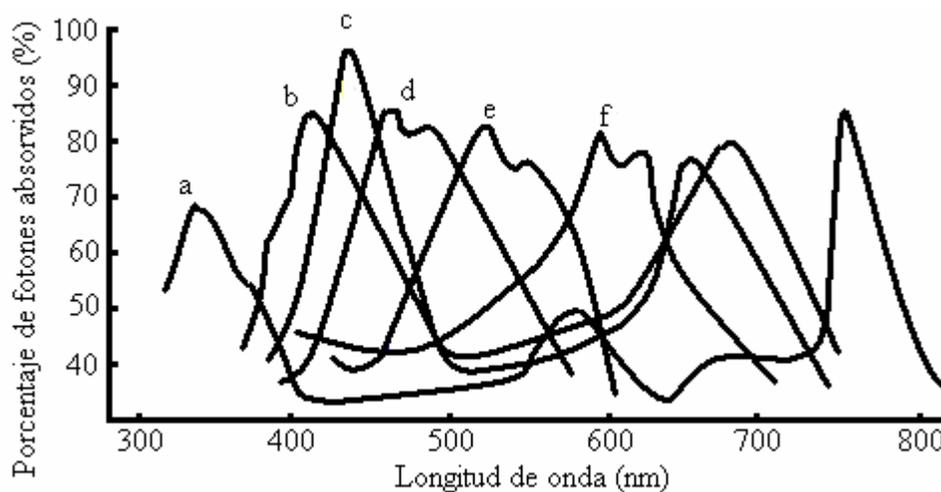


Fig. 1.3 Espectro de absorción de algunos pigmentos fotosintéticos. a) Bacterioclorofila b) Clorofila a c) Clorofila b d) Carotenos e) Ficoeritrina f) Ficocianina.

Duración. El proceso de la fotosíntesis puede mantenerse normalmente en la mayoría de las plantas durante largos períodos de exposición a la luz, sin que se observen ningún efecto dañino notable para las plantas. Todo parece indicar que cuando la planta está expuesta a un período largo de luz, tiene más posibilidades de realizar mayor cantidad de fotosíntesis; no obstante, los períodos prolongados de iluminación pueden traer otras consecuencias secundarias al estado fisiológico de la planta, ya que el período de iluminación puede ir acompañado a altas temperaturas, lo cual suele ocasionar una pérdida prolongada de agua en la planta y afectar su balance hídrico y el valor de la actividad fotosintética.

FFF. La intensidad de la fotosíntesis guarda una relación directa con la FFF, dentro de determinados intervalos, cuando no existe ningún otro factor limitante. Si iluminamos una planta con una luz de baja FFF, el resultado será la fijación de cierta cantidad de CO_2 y el desprendimiento de cierta cantidad de O_2 .

Si el FFF es muy poca, la cantidad de CO_2 fijado en la fotosíntesis será menor que la cantidad de CO_2 desprendido en la respiración. Cuando la FFF aumenta se llega a alcanzar un punto en el que el cambio fotosintético de gases se equilibra, es decir, la cantidad de CO_2 fijado en la fotosíntesis será igual al CO_2 desprendido en la respiración. En este punto el intercambio neto de gases es nulo, por lo que recibe el nombre de punto de compensación. A medida que la FFF va aumentando, la cantidad de CO_2 absorbido va siendo mayor que la cantidad de CO_2 desprendido, de manera que en un intervalo considerable, el valor del intercambio fotosintético de gases va aumentando proporcionalmente a la FFF, pero cuando esta alcanza un valor suficientemente elevado, su incremento no va acompañado del aumento correspondiente de actividad fotosintética; en este caso la planta ha alcanzado el punto de saturación luminosa. La fig. 1.4 muestra el comportamiento antes descrito en la gráfica de saturación de la luz.

Cuando la planta está lumínicamente saturada, nuevos incrementos en la FFF no van acompañados del aumento correspondiente de la actividad fotosintética y otro factor (la concentración de CO_2 o la temperatura) puede estar, en este caso, limitando la fotosíntesis.

El valor de la fotosíntesis se mantendrá estacionario hasta tanto no se eleve el factor limitante. En la fig. 1.5 se observa el efecto del aumento de la actividad fotosintética a distintas temperaturas.

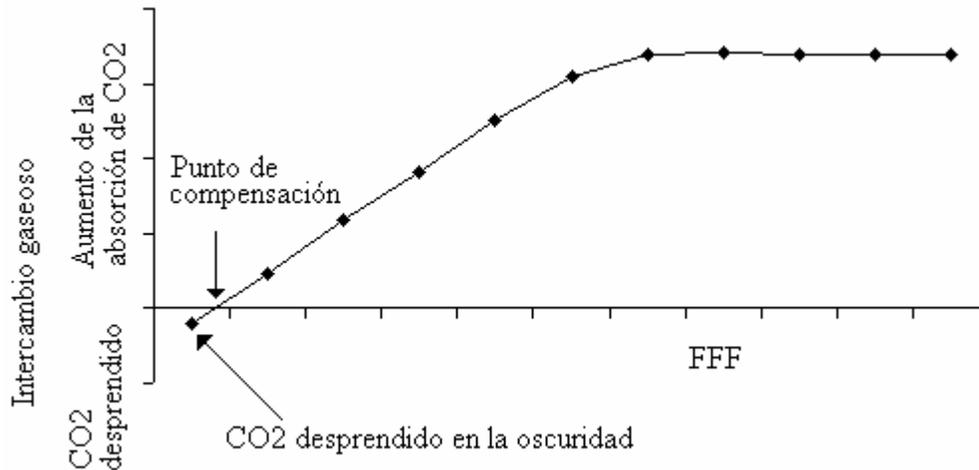


Fig. 1.4 Incremento de la intensidad fotosintética por variación de la FFF. En el punto de compensación la fotosíntesis y la respiración están equilibradas.

Se observa que la actividad fotosintética no se incrementa con la FFF a partir de cierto valor. Pero al aumentar la temperatura desde un valor menor hasta un valor mayor se obtiene un incremento de la actividad fotosintética sin variar prácticamente el punto de FFF donde ocurre la saturación. En este caso se demuestra que la temperatura actúa como factor limitante de la fotosíntesis. La FFF en esta experiencia era suficiente para activar los electrones de la clorofila; sin embargo, las reacciones enzimáticas de la fotosíntesis se producían con gran lentitud a menor temperatura y no lograban su máxima velocidad hasta tanto no se aumentó la temperatura.

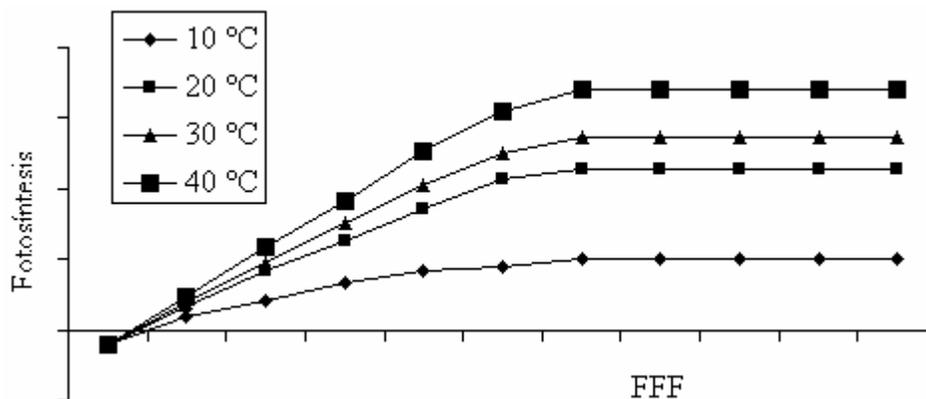


Fig. 1.5 Efecto de distintas temperaturas sobre la intensidad de la fotosíntesis.

b) Concentración de CO₂. En el aire atmosférico existe una concentración aproximadamente de 0,03% (350 ppm), en cantidades relativamente constante, pero en

aumento a partir de la revolución industrial. A esta concentración se realiza, en mayor o menor, grado, el proceso de la fotosíntesis de las plantas verdes, dependiendo en gran medida de las condiciones en que se encuentren los demás factores influyentes.

En la fig. 1.6 se representa la intensidad de la fotosíntesis bajo diferentes FFF con variaciones en las concentraciones de CO_2 . Se observa que el valor de la fotosíntesis no aumenta con el incremento de la concentración de CO_2 (en condiciones controladas) en el intervalo estudiado; sin embargo, va aumentando considerablemente cuando se eleva el valor de la FFF. Esto nos indica que la luz es un factor limitante en la fotosíntesis.

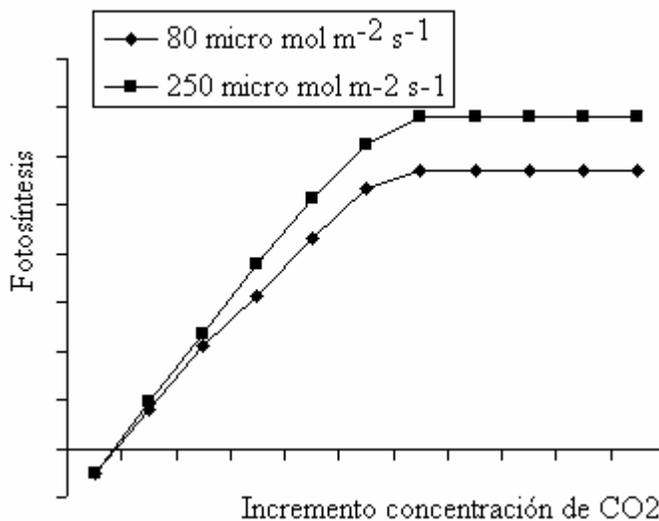


Fig. 1.6 Influencia de la concentración de CO_2 sobre la intensidad de la fotosíntesis, bajo diferentes FFF.

c) Temperatura. La fotosíntesis al igual que todos los procesos vitales, queda limitada entre ciertos extremos de temperatura que corresponden a los tolerados por los compuestos proteicos, los cuales suelen estar entre 0 y 60°C , con algunas variaciones, en dependencia de la especie vegetal.

La temperatura puede acelerar o retardar las reacciones bioquímicas de la segunda fase del proceso fotosintético y aun en condiciones en que el CO_2 sea escaso. Si hay buena iluminación y buen abastecimiento de agua, generalmente un incremento de la temperatura dentro de cierto intervalo vital acelera la fijación del CO_2 atmosférico.

Aunque las oscilaciones térmicas no afectan de forma directa la primera fase de la fotosíntesis (fotoquímica) porque esta fase depende de la FFF, el hecho de que se vea retrasada o acelerada la segunda fase (oscura o bioquímica) por efecto de la temperatura,

transciende a su vez en la primera fase. Por ejemplo, cuando se produce una elevación tal de temperatura que provoca la marchitez incipiente o temporal de la planta, con el consiguiente cierre de los estomas, se limita con ello la entrada del CO_2 atmosférico y se retardan las reacciones de la segunda fase de la fotosíntesis; esto provoca que el NADPH_2 permanezca en parte reducido y no acepte los electrones de la ferredoxina, limitando con ello la fotofosforilación acíclica. Es decir, que la temperatura afecta de forma indirecta la segunda fase de la fotosíntesis al afectar la primera. Este efecto térmico no afecta la fotofosforilación cíclica, que solo depende de la FFF. Si la elevación de la temperatura provoca la desnaturalización de la enzimática, entonces si se verán limitadas ambas fases y el proceso de la fotosíntesis en su totalidad.

En resumen podemos decir que la temperatura influye favorablemente en la fotosíntesis, dentro de cierto intervalo cuando su elevación induce una mayor actividad de las enzimas, principalmente las fijadoras de CO_2 , pero ocasiona efectos desfavorables cuando su elevación provoca el cierre estomático, de manera tal que se limita la entrada del CO_2 atmosférico, y la fotofosforilación cíclica. Por otra parte temperaturas muy bajas retardan las reacciones bioquímicas y muy altas provocan la desnaturalización de las enzimas.

El tiempo que ha estado una planta a una temperatura elevada determinada influye también en la fotosíntesis. Se ha observado que plantas sometidas mayor tiempo a una temperatura mayor presentan un punto de saturación menor que plantas sometidas a igual temperatura pero en un menor tiempo. Este hecho está estrechamente ligado al efecto que provoca la temperatura sobre las enzimas (teoría de inactivación enzimática a altas temperaturas).

d) Agua. En la fotosíntesis se emplea menos del 1% del agua que absorbe la planta; por consiguiente, parece probable que los efectos indirectos del agua sobre este proceso son más pronunciados que sus efectos directos. Dicho de otra forma, la deficiencia de agua como materia prima, rara vez o nunca es el factor limitante de la fotosíntesis. Sin embargo, la reducción en el contenido hídrico de las hojas se traduce comúnmente en disminución de la actividad fotosintética. Los efectos del déficit de agua son causados primeramente por la disminución en la hidratación de los cloroplastos y otras partes del citoplasma y segundo por el cierre de los estomas.

La eficiencia de las enzimas va ligada con la hidratación del citoplasma, la cual inhibe la intensidad en todos los procesos vitales; entre ellos el de la fotosíntesis que es uno de los

más sensibles a la deshidratación, puesto que causa daños a la estructura micromolecular de la unidad fotosintética.

Por otra parte cuando se cierran los estomas producto del déficit de agua decrece la absorción de CO_2 y por consiguiente una disminución de la actividad fotosintética.

e) Concentración de O_2 . Concentraciones de O_2 por encima del 21% puede inhibir la fotosíntesis en la planta. Las causas son:

- El oxígeno es utilizado en la respiración proceso que compite con la fotosíntesis para la obtención de algunas sustancias intermediarias importantes.
- El oxígeno puede competir con el CO_2 por la obtención de hidrógeno y sufrir una reducción en lugar del CO_2 .
- El oxígeno puede reaccionar con la clorofila en estado triplete haciendo que esta regrese a su estado normal, por lo que se inhibe el proceso fotosintético.

f) Nutrición mineral. La deficiencia de algunos minerales puede provocar alteraciones en el proceso fotosintético.

La deficiencia de minerales constituyentes de la clorofila como son el nitrógeno y el magnesio, puede ocasionar trastornos en la formación de este pigmento. Por otra parte el cobre es un importante componente en un compuesto encargado del transporte de electrones. El fósforo inorgánico (Pi) es necesario en la formación de ATP producido en los cloroplastos durante la fotosíntesis. El manganeso forma parte de las coenzimas que intervienen en la fotólisis del agua.

1.3.2.3 La transpiración.

La pérdida de agua desde los órganos aéreos en forma de vapor de agua se conoce como transpiración y es una consecuencia natural de las características anatómicas fundamentales de las plantas.

El agua que las raíces toman del suelo ascienden a todo lo largo del tallo y es cedida al aire en forma de vapor desde las hojas u otros órganos aéreos a través de los estomas, las fisuras cuticulares y las lenticelas. La transpiración cuticular y lenticular se consideran despreciables en comparación con la transpiración estomática.

Solo una pequeña porción de agua absorbida por las plantas es empleada en sus procesos metabólicos, por lo general mucho menos del 1%. La mayor parte del agua absorbida por las raíces se pierde en la transpiración desde las hojas.

Un aumento de la transpiración trae como resultado un aumento de la absorción de agua a través de las raíces. Este fenómeno se puede ver mejor en el caso de que halla escasez de agua en el suelo. También se logra una mayor absorción de sales minerales. La transpiración también ayuda a que la temperatura en la superficie de las hojas no aumente considerablemente.

1.3.2.4 Los factores que influyen sobre la intensidad de la transpiración.

Los factores que influyen sobre la transpiración son:

a) Luz. Con la luz se regulan los estomas y a su vez la transpiración. Con los estomas abiertos se producirá transpiración. Si los estomas están cerrados no se podrá realizar la transpiración y ningún otro factor podrá influir sobre la transpiración.

b) Humedad relativa. La humedad relativa no es más que el cociente entre la cantidad de vapor de agua que contiene el aire y la cantidad máxima que es capaz de contener a la misma temperatura.

Cuando la humedad relativa interna y externa a la hoja están igualadas no ocurrirá la transpiración. El agua siempre fluirá de un punto de mayor a uno de menor humedad relativa. En el interior de las hojas la misma se encuentra prácticamente al 100% y en el exterior generalmente está sobre el 80% por lo que aumentando la humedad relativa en la atmósfera tiende a disminuir la transpiración.

c) Temperatura. Aumentos de la temperatura provocan aumentos en la transpiración. Altas temperaturas hacen disminuir la transpiración indirectamente ya que provoca el cierre de los estomas.

d) Velocidad de los vientos. Cuando aumenta la circulación de aire se produce un desplazamiento de las capas de vapor de agua en la superficie de las hojas por lo que la transpiración se ve acelerada a medida que la velocidad de los vientos es mayor.

1.3.2.5 La respiración.

La respiración es un proceso común a todos los seres vivos y consiste esencialmente en la oxidación enzimática de sustancias de reservas, tales como glúcidos, proteínas y lípidos, con la consiguiente liberación de energía necesaria para los procesos de síntesis de la materia viva, el transporte de productos orgánicos y la absorción de nutrientes minerales

entre otros. Se manifiesta externamente como la absorción de O_2 y el desprendimiento de CO_2 , la oxidación de sustancias alimenticias (disminución de la masa seca) y la liberación de energía.

Solamente una porción de la energía liberada es usada para formar compuestos del tipo ATP. El resto de la energía se pierde en forma de calor sin prácticamente ninguna utilidad para el organismo. La energía liberada en el proceso respiratorio es requerida por otros procesos como el transporte de sustancia de células a células, la acumulación de sales minerales, la maduración de los frutos, etc. A su vez, la respiración necesita del sustrato producido en la fotosíntesis, de las sales minerales absorbidas por las raíces y del traslado de solutos orgánicos.

La función principal de la respiración es la liberación de energía susceptible de ser empleada (ATP) a costa de un consumo de ADP y Pi. La energía química cedida al ATP puede ser empleada para llevar adelante reacciones de síntesis, con lo cual se libera ADP y Pi.

Como se menciona arriba, en la respiración además de consumir energía, se pierde masa. La ecuación siguiente es la ecuación general de la respiración.



Cierta parte de los azúcares producidos en la fotosíntesis es dedicada a la síntesis de sustancias más complejas, tales como las proteínas, la celulosa, las pectinas y otras que pasan a formar parte del citoplasma, las paredes celulares y las membranas citoplasmáticas de nuevas células, para todas las cuales se requiere energía liberada en el proceso respiratorio.

1.3.2.6 Los factores que influyen sobre la intensidad de la respiración.

Los factores que influyen sobre la intensidad de la respiración se relacionan a continuación:

a) Temperatura. Dentro de ciertos límites, el aumento de temperatura da como resultado un aumento de la actividad respiratoria. Como las reacciones de respiración, al igual que la mayoría de las reacciones bioquímicas, están reguladas por enzimas, los límites de temperaturas dentro de los cuales pueden tener lugar son muy estrechos. La intensidad respiratoria se hace de dos a cuatro veces mayor por cada aumento de temperatura de $10^\circ C$,

siempre dentro de un intervalo de temperatura característico para cada especie. La intensidad respiratoria de los tejidos en activo crecimiento se incrementa fuertemente con aumento de la temperatura dentro del intervalo biológico de 0 a 45°C. Las temperaturas muy elevadas pueden reducir la actividad respiratoria por desnaturalización de las encimas; igualmente a temperaturas próximas a 0°C la intensidad respiratoria se hace muy baja.

El hecho de que la actividad respiratoria se reduzca a temperaturas altas después de cierto período de tiempo, se explica por una inactivación progresiva de las encimas a medida que aumenta la temperatura, y porque otros factores se hacen limitantes: el oxígeno no tiene acceso con suficiente rapidez a la célula como para mantener tan alta actividad respiratoria, la provisión de material oxidable es insuficiente para mantener alta la actividad respiratoria, etc.

b) Concentración de O₂. La respiración como proceso aerobio, requiere indudablemente de la presencia de oxígeno para llevarse a cabo. Este gas es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria hacia el cual se mueven los electrones que van cediendo la energía necesaria para la síntesis de ATP. Sin oxígeno no se realiza esta parte del proceso respiratorio que es la que mayor cantidad de energía pone a disposición de las células de los organismos aerobios.

A medida que la concentración de O₂ del medio crece, aumenta la liberación aerobia de CO₂ y se reduce la producción anaerobia (fermentación) de CO₂.

La alta concentración de O₂ incrementa la liberación de CO₂ por respiración, tanto en la zona radicular como en las partes aéreas. En estas últimas resulta extremadamente difícil que la concentración de O₂ se reduzca de forma natural, a valores tan bajo que se inhiba la respiración. Por el contrario, se ha comprobado que las altas concentraciones de O₂ de la atmósfera incrementan la producción de CO₂ de las hojas de plantas de ciclo C3 que se encuentran expuestas a la luz. Este incremento provoca una pérdida innecesaria de sustancia que reduce la asimilación neta de dichas plantas y las hace menos productivas. Esto se debe a que ocurre otro proceso llamado fotorrespiración. La fotorrespiración es siempre mucho menor que la respiración por lo que se puede despreciar.

c) Concentración de CO₂. La influencia del CO₂ en la respiración depende de su concentración y el período de exposición entre otras. Altos valores de concentración de CO₂ en la atmósfera pueden llegar a reducir la intensidad respiratoria pero es muy difícil

que en la atmósfera se produzcan estos aumentos. Es en el suelo donde la concentración de CO₂ puede llegar a alcanzar valores del 10% y a la vez disminuir la concentración de O₂ por tanto es en la raíces donde la concentración de CO₂ provoca sus mayores efectos.

d) Concentración de sales inorgánicas. Un aumento de las sales inorgánicas provoca que aumente la respiración ya que las plantas tienden a acumularlas en contra del gradiente de concentración con un gasto de energía producida por el proceso respiratorio.

e) Disponibilidad de sustratos respiratorios. Cuando aumenta el contenido de alimentos solubles en las células vegetales regularmente se produce un incremento de la actividad respiratoria hasta un cierto punto en el cual otro factor se hace limitante. Esto puede demostrarse midiendo la respiración de hojas etioladas (hojas que crecen en la oscuridad) y hojas que han estado expuestas a la luz.

La actividad respiratoria de las hojas de plantas que han estado expuestas a la luz es superior a la de aquellas que permanecieron en la oscuridad, lo que indica que la cantidad de sustrato respiratorio producido en la fotosíntesis actúa sobre la velocidad de la respiración.

1.4 Breve resumen del capítulo.

En este capítulo hemos entrado en el mundo de la micropropagación como una técnica para el cultivo en gran escala de plantas tanto ornamentales, frutales, etc. Se han analizado las ventajas y las desventajas de la misma siendo los desórdenes que presentan las plantas producto de las condiciones ambientales de cultivo la principal causa de los altos porcentajes de muertes en el proceso de adaptación de las plantas a la vida en las casas de cultivo. Las variables ambientales que más ligado están a estos desórdenes son la humedad relativa y la concentración de azúcares en el medio de cultivo.

Para saber como poder influir en una mejor adaptación de las plantas a las condiciones reales estudiamos fenómenos como la difusión de sólidos, gases y la osmosis como un tipo de difusión de líquidos así como los factores ambientales que pueden influir en ellos.

Además, hemos conocido como es que las plantas cultivadas en ambiente *ex vitro*, es decir, las que normalmente conocemos, realizan la fotosíntesis, la respiración y la transpiración siendo estos procesos de los que la planta depende cuando es llevada a las casas de cultivo para sobrevivir. También, se han analizado los factores ambientales y condiciones del

medio que influyen sobre la realización de estos procesos para comprender que ocurre en el cultivo *in vitro* y posteriormente con los biorreactores de inmersión temporal.

En el próximo capítulo se hace un estudio del comportamiento de la fotosíntesis, la respiración y la transpiración en el cultivo *in vitro* y como se comportan las variables ambientales en esa forma de cultivo. También se hace una pequeña introducción a los biorreactores de inmersión temporal y se diseña un experimento para estudiar el comportamiento de las variables ambientales en este nuevo método de cultivo y su influencia sobre los procesos anteriormente mencionados.

CAPÍTULO 2

2 LAS PLANTAS Y SU COMPORTAMIENTO EN AMBIENTE *IN VITRO*.

En este capítulo vemos como se comportan las condiciones ambientales en el cultivo *in vitro* y su efecto sobre la fotosíntesis, la respiración y la transpiración de las plántulas.

También se da una explicación del funcionamiento de los biorreactores de inmersión temporal, así como el equipamiento utilizado para su montaje y un esquema con las conexiones empleadas.

2.1 Las variables de una planta y su comportamiento en ambiente *in vitro*.

Como hemos analizados hasta ahora en las plantas influyen muchos factores ambientales que desde el punto de vista de control son consideradas variables. En este capítulo pretendemos dar una explicación de cómo se comportan en el cultivo *in vitro*. Las variables de entrada de más importancia debido al efecto que producen sobre los procesos que ocurren en las plantas son: FFF, concentración de CO₂, humedad relativa, temperatura, composición del medio de cultivo y la circulación del aire. Hay que aclarar que la capacidad fotosintética, la respiración y la transpiración son variables de salida de todo el proceso en general que es el crecimiento de las plantas.

2.1.1 La composición del medio de cultivo.

En el proceso de la micropropagación convencional las plántulas son cultivadas bajo la presencia de azúcares (C_nH_{2n}O_n) en los medios de cultivos. Las plántulas, en la etapa de aclimatización, crecen sin la presencia de estas sustancias en el sustrato. En otras palabras se puede decir que las plántulas en las primeras etapas tienen un comportamiento mixotrófico con tendencias al heterotrofismo y en la etapa de aclimatización su comportamiento es autotrófico. Las plántulas con comportamiento heterotrófico y mixotrófico necesitan de nutrientes orgánicos como azúcares los cuales son utilizados como fuente de energía y de carbono para su crecimiento. Las plantas autotróficas requieren una fuente de energía inorgánica como la FFF, CO₂, agua y minerales siendo capaces mediante

la fotosíntesis de producir los compuestos orgánicos. Mixotrofismo significa parte autotrofismo y parte heterotrofismo.

Dentro de los componentes del medio de cultivo tenemos sustancias inorgánicas y orgánicas. Los reguladores del crecimiento, minerales, y demás componentes del medio están definidos según el protocolo de propagación para cada especie independientemente de que a diario surgen nuevos reguladores del crecimiento. Sin embargo en el medio de cultivo también encontramos sustancias carbonadas dando lugar a que el comportamiento de las plantas sea fotomixotrófico con tendencias al heterotrofismo. Este medio rico en glucosas es el causante principal, junto con la disminución de la concentración de CO₂ y bajo FFF de que las plantas realicen muy poca fotosíntesis (Kosai y col., 1986; Murai y col., 1992).

En presencia de azúcares en el medio de cultivo, las plántulas absorben los alimentos por la raíces y no necesitan de la fotosíntesis para la formación de glucosas. Sucede que en ambiente *ex vitro* el suelo no tiene presencia de azúcares y si hay una atmósfera enriquecida de CO₂ y alto FFF pero al no tener las plántulas la capacidad de realizar la fotosíntesis no pueden aprovechar esta situación llegando a morir. La concentración de azúcares del medio como hemos visto es fundamental.

2.1.2 La iluminación.

La iluminación es uno de los factores ambientales que más influyen en la fotosíntesis de las plantas por formar parte del proceso. Como hemos visto hasta ahora hay que considerar tres puntos a la hora de hablar de la iluminación. Ellos son la calidad, duración y la FFF con que se ilumine el cultivo.

a) Calidad. La FFF utilizada en ambientes *in vitro* presenta algunas ventajas con respecto a la FFF solar. La FFF proveniente del sol nos da una iluminación que va desde los 300 nm hasta los 3000 nm aproximadamente mientras que para la fotosíntesis solo se necesita desde 400 nm hasta 700 nm aproximadamente.

En la actualidad lo más utilizado son las lámparas fluorescentes. Estos tipos de luces nos brindan una FFF donde está presente todo el espectro de frecuencias por lo que los distintos pigmentos pueden ser excitados. También se utiliza la FFF proveniente del sol pero antes es filtrada en una piscina, colocada en el techo de la cámara de cultivo, de sulfato de cobre donde en dependencia del nivel de la piscina será la longitud de onda que deje pasar. Aquí

se filtra fundamentalmente las longitudes de onda del infrarrojo que son las que más calor aportan y no son utilizadas en el proceso de la fotosíntesis.

b) Duración. La duración de la iluminación (fotoperíodos) actualmente puede variar desde cuatro horas de iluminación y dos horas de oscuridad, o sea con una relación iluminación/oscuridad de 8/4, 12/6 y 16/8, obteniéndose siempre muy buenos resultados en cuanto a niveles de realización de fotosíntesis en el caso de 4/2. Esto tiene su explicación producto de que en cuatro horas de iluminación ya la planta acabó de consumir todo el CO₂ (mediante la fotosíntesis) que estuvo liberando en el período de oscuridad mediante la respiración y por tanto la concentración de CO₂ disminuyó y paso a ser el factor limitante que no deja que la planta realice la fotosíntesis en todas sus posibilidades. Solo realizará la fotosíntesis con el CO₂ que se libere de la respiración.

Si se tuviera una mayor concentración de CO₂ durante el período de iluminación y con una FFF suficiente se puede aumentar el tiempo de exposición de las plantas a la FFF trayendo como consecuencia una menor dependencia de las fuentes de carbono que hay en el sustrato, es decir, alejarlas del comportamiento heterotrófico y acercarlas al comportamiento autotrófico influyendo en la capacidad de realización de fotosíntesis de las plantas.

c) FFF. La FFF es el factor de más importancia y el que más dificultades presenta. Basta decir que a pleno mediodía la FFF proveniente del sol llega a alcanzar valores cercanos a los 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a nivel de laboratorio la mayoría de los protocolos de propagación establecen 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independientemente de que la FFF a la cual las plantas en cultivo alcanzan la saturación luminosa está muy por encima (El eucalipto, especie analizada en este trabajo se satura a una FFF de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aproximadamente). Para conseguir este valor (80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se utilizan varias lámparas fluorescentes colocadas en el estante lo más cerca de los frascos de cultivo, garantizando de que no haya un aumento considerable de la temperatura, producto de que a mayor distancia menor será la FFF que llegue al frasco de cultivo. También influye el orden que tengan los frascos de cultivo debajo de las lámparas. Como se ha analizado, una de las causas de bajo realización de fotosíntesis, es la baja FFF con que se realizan los cultivos. Baja realización de fotosíntesis conlleva a que las plantas, en ausencia de azúcares en el medio, no pueden elaborar las glucosas necesarias para ser consumidas en la respiración y por tanto mueren.

2.1.3 La concentración de CO₂.

Varios autores han descrito el comportamiento de las concentraciones de CO₂ dentro de los frascos de cultivo para un sin número de especies vegetales (Fujiwara y Kosai, 1994a). En la fig. 2.1 se muestra el caso de la especie *Ficus lyrata*.

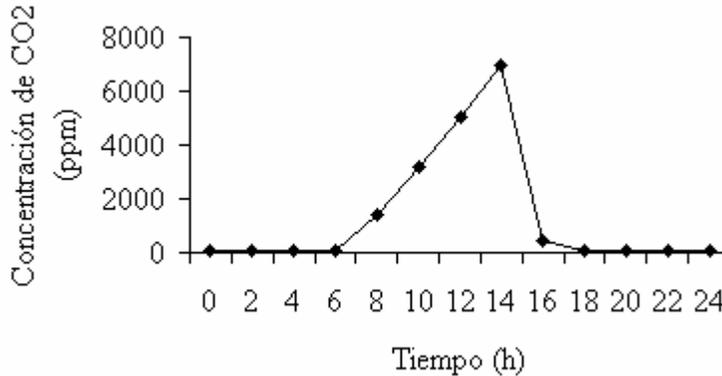


Fig. 2.1 Cambios en la concentración de CO₂ dentro del frasco de cultivo de *Ficus lyrata*. El período oscuro es a partir de las 6 horas hasta las 14 horas. El fotoperíodo es desde la 0 hora hasta las 6 horas y desde las 14 horas hasta las 24 horas. Fue cultivada con un FFF de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a una temperatura de 25°C.

Se puede generalizar que en un ambiente cerrado la concentración de CO₂ se mantiene la mayor parte del tiempo en el punto de compensación (10–80 ppm), por debajo de 350 ppm que es la concentración de CO₂ que nos encontramos en la atmósfera. Durante el período oscuro se produce un aumento lineal de la concentración de CO₂ en el frasco de cultivo. Este aumento puede llegar hasta valores de 3000-9000 ppm en dependencia de la especie tratada. Cuando comienza el fotoperíodo ocurre una drástica disminución de la concentración hasta alcanzar el punto de compensación. Esta disminución dura cerca de dos o tres horas a partir que comienza el fotoperíodo. Esto es explicado ya que las plántulas tienen la habilidad de hacer fotosíntesis y al cabo de las dos horas ya han consumido todo el CO₂ que se encontraba en el frasco de cultivo y entra en un equilibrio entre la fotosíntesis y la respiración. También ocurre que la fotosíntesis neta es restringida por los bajos niveles de CO₂ lo cual fuerza a la planta a tener un comportamiento fotomixotrófico y alta FFF no producirá un aumento en la fotosíntesis neta por los bajos niveles de concentración de CO₂ como ya se había explicado anteriormente.

Bajo condiciones de baja concentración de CO₂ dentro del frasco de cultivo la realización de fotosíntesis en las plántulas es cerca de cero por lo que se produce un balance negativo

de CO₂ en las plántulas. Esto significa que los niveles de realización de fotosíntesis durante el tiempo de iluminación es menor que los niveles de respiración en la oscuridad.

La baja concentración de CO₂ revela la capacidad de las plantas para realizar fotosíntesis siendo esto de gran interés para el cultivo de plántulas en régimen fotomixotrófico con tendencias al autotrófico. En el cultivo autotrófico no hay azúcar o se encuentra en pequeñas cantidades en el medio de cultivo por tanto el crecimiento y el desarrollo de la plántula depende solamente de los niveles de realización de fotosíntesis.

2.1.4 La humedad relativa.

En todo momento la humedad relativa dentro del frasco de cultivo se encuentra cerca del 100%. Esto se explica debido a que el medio de cultivo es líquido y al estar las plantas constantemente realizando la transpiración se mantiene la atmósfera interior del frasco de cultivo casi completamente saturada para la temperatura que se encuentre. La alta humedad relativa es la causante de muchos trastornos fisiológicos en las plantas. Estos trastornos están vinculados directamente con los mecanismos encargados de realizar la transpiración. Esto no es conveniente porque al ser llevada la planta a la etapa IV de aclimatización, donde la humedad relativa está cerca de 70-80%, y heredar de etapas anteriores estas dificultades se produce una deshidratación en muy poco tiempo lo cual trae como consecuencia la muerte de las plántulas. Otra consecuencia de estos problemas es que se necesite una etapa de aclimatización larga para garantizar la supervivencia cuando las plantas son llevadas al campo abierto.

2.1.5 La temperatura.

Las diferentes fuentes de calor que existen en el cultivo *in vitro* son principalmente las fuentes de FFF, y para combatir este aumento de temperatura se usan acondicionadores de aire en las cámaras de cultivo. Los circuitos eléctricos vinculados al encendido de las lámparas no se toman en cuenta ya que estos son colocados fuera de la cámara de cultivo. La iluminación y la temperatura tienen una estrecha relación producto de que si acercamos las lámparas a los frascos de cultivo la FFF que llegará será mayor pero también será mayor el aumento de la temperatura en el interior y exterior del frasco de cultivo. Esto no es conveniente por el efecto directo de la temperatura sobre la actividad enzimática como se analizó en el primer capítulo.

Independientemente de esto, con un sistema de acondicionador de aire se logra mantener la temperatura dentro de los frascos de cultivo en 25 °C, temperatura considerada como óptima para muchas especies incluida el eucalipto. Es necesario aclarar que la temperatura dentro del frasco de cultivo y la de la cámara de cultivo no es la misma. Adentro del frasco de cultivo la temperatura es mayor entre 1 y 2 °C.

2.1.6 La circulación del aire dentro del frasco de cultivo.

En ambiente *in vitro* el aire dentro del medio de cultivo no circula independientemente de que haya conexión con el medio exterior a través de filtros colocados a la boca de los frascos de cultivo. Esto contribuye a un aumento de la humedad relativa cerca de la planta debido a que el vapor que sale de las plantas por la transpiración se queda cerca de la misma llegando a formar gotas de agua en las hojas de las plantas.

2.1.7 La fotosíntesis.

La fotosíntesis es un proceso de una importancia enorme para la supervivencia de las plantas en cualquier lugar. Las condiciones ambientales de baja FFF, baja concentración de CO₂, alta humedad relativa, escaso intercambio de gases con el medio ambiente y altas concentraciones de azúcares en el medio de cultivo influyen de forma directa en la baja capacidad de realización de fotosíntesis ya que las plantas cultivadas *in vitro* y *ex vitro* presentan la misma cantidad de clorofila, es decir, no hay diferencia en la cantidad de sistemas para realizar la fotosíntesis pero hay escasez de la materia prima utilizada en el proceso y además se le puede unir a esto que obtienen las glucosas ya elaboradas del sustrato. Se pudiera influir en sentido de aumentar la capacidad de realización de fotosíntesis en las plantas disminuyendo la concentración de azúcares en el medio de cultivo. Otro síntoma que se puede observar provocado por la ausencia de fotosíntesis es que existe un balance negativo de CO₂.

En ambiente *in vitro* las plantas no mueren debido a que obtienen la fuente de carbono del medio de cultivo, no como normalmente lo deberían de hacer que es a través del CO₂ que se encuentre en el ambiente y pasar a fijarlo a través de la fotosíntesis.

2.1.8 La transpiración.

Las condiciones *in vitro* de cultivo ayudan a que los niveles de transpiración sean bajos. La alta humedad relativa y el bajo potencial hídrico influyen de forma que la transpiración es

disminuida y los órganos que se encargan de regularla como las estomas, raíces y el sistema conductor estén atrofiados. Como hemos analizados anteriormente los estomas presentan la característica de que son redondos y no elípticos como deben de ser. Otra causa que provoca que la transpiración sea disminuida es que no hay una buena conexión entre los vasos conductores (xilema) que se encargan de transportar los minerales y el agua absorbidos por las raíces. Los granos de almidón en las raíces también conducen a que la absorción de agua en las raíces se vea disminuida.

2.1.9 La respiración.

La respiración *in vitro* no presenta variaciones con respecto a la que ocurre en ambiente *ex vitro*. Esto es debido a que independientemente de que las plantas no producen el sustrato respiratorio por el mecanismo de la fotosíntesis si lo obtienen a través de la toma de azúcares del medio de cultivo. Además la concentración de O₂ dentro del frasco de cultivo se mantiene prácticamente igual a la que existe en el ambiente (21%). Para que haya cambio significativo en la respiración se debe bajar la concentración de O₂ al 10%. (Fujiwara y Kosai 1994b).

2.2 El montaje del biorreactor de inmersión temporal.

Un biorreactor de inmersión temporal consiste en un sistema a lazo abierto que, gobernado por un autómata MASTER-K10S1 de la firma LG, permite realizarle baños periódicos, con un medio de cultivo determinado, a plántulas. Estas plántulas han sido cultivadas usando la técnica de la micropropagación y pasaron la etapa III dentro del BIT. La fig. 2.2 ayudará a comprender su funcionamiento.

Para lograr los baños se monta un frasco con el cultivo y otro frasco solo con el medio de cultivo como se muestra en el anexo B. Estos frascos son conectados mediante tuberías de silicona con filtros hidrófobos de 0.2 μm a la entrada de cada frasco para evitar cualquier tipo de contaminación. Se utilizó un botellón de CO₂ para enriquecer la concentración de CO₂ en la atmósfera dentro del frasco de cultivo. Además, una bomba de aire y una electroválvula de 5 vías y 3 posiciones (SMC SY5420-5DZ-01F) que permite cambiar la configuración de las conexiones según necesite para bombear el líquido de un frasco a otro. Todas las operaciones son gobernadas por el autómata, cuyo programa podemos encontrar en el anexo C el cual se encarga de conocer que tiempo tiene que mantener sumergida la

plántula en el medio y que tiempo en la atmósfera de CO_2 . Los datos de la válvula están en el anexo D.

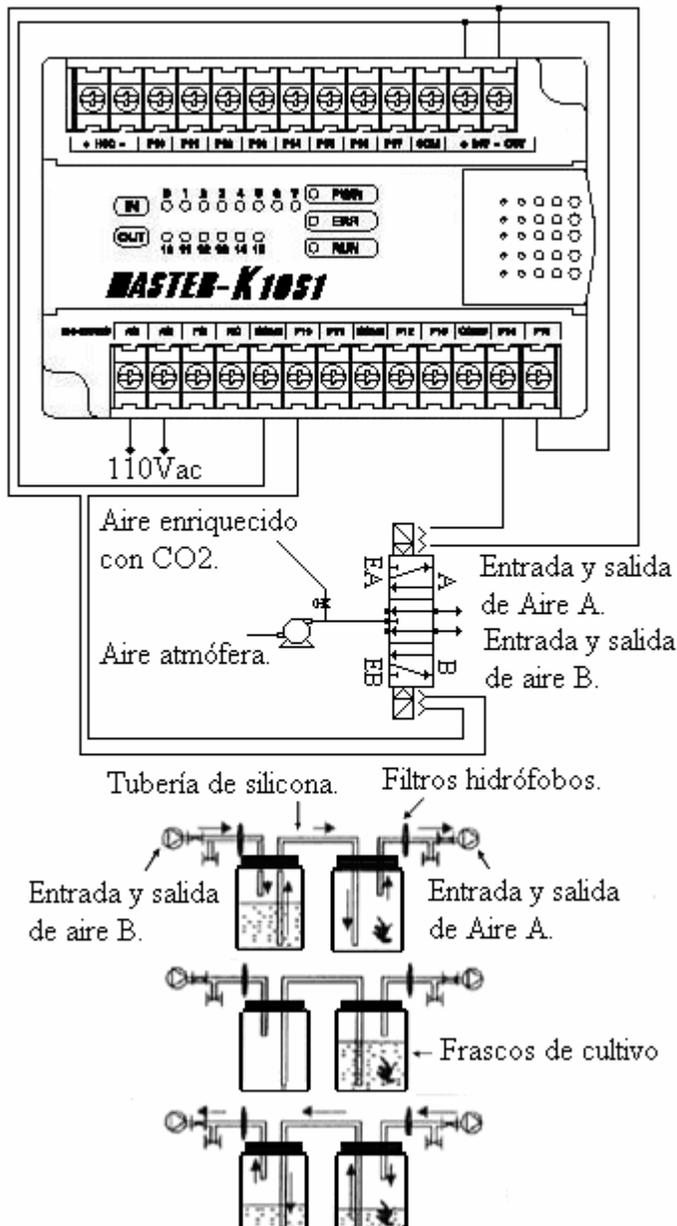


Fig. 2.2 Diagrama del BIT incluyendo autómata, válvula, filtros, tuberías, cables y frascos de cultivo.

2.3 Un circuito para el control de la FFF.

El circuito que se muestra en el anexo E logra suministrar a las plántulas hasta un FFF de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el experimento realizado con el BIT solo se suministró un FFF máximo de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En la fig. 2.3 se muestra un diagrama simplificado de los

distintos bloques en los que se puede dividir el circuito para una mejor comprensión de su funcionamiento.

El detector de cruce por cero, formado por T1 y T2, se utiliza para sincronizar el diente de sierra el cual se forma por la carga y descarga del capacitor de 0.1 μF . En la base de T3 obtenemos el diente de sierra. El bloque del punto de ajuste está formado principalmente por el potenciómetro P1 que es utilizado para regular la FFF, el potenciómetro P2 y P3 que lo que hacen es regular la FFF máxima y mínima respectivamente. Los transistores T3, T4, T5, T6 está puesto de forma tal que funcionan como comparador. Al tener a la entrada del comparador un voltaje de referencia y un diente de sierra, a la salida tengo una especie de modulación por ancho de pulso. En dependencia de si la salida del comparador esté en estado alto o bajo estará oscilando o no el oscilador de bloqueo formado por T7.

El oscilador de bloque es el encargado de disparar los tiristores el cual cuenta con protecciones para dV/dt y dI/dt . La lámpara utilizada para la iluminación es de halógeno (220 Vac).

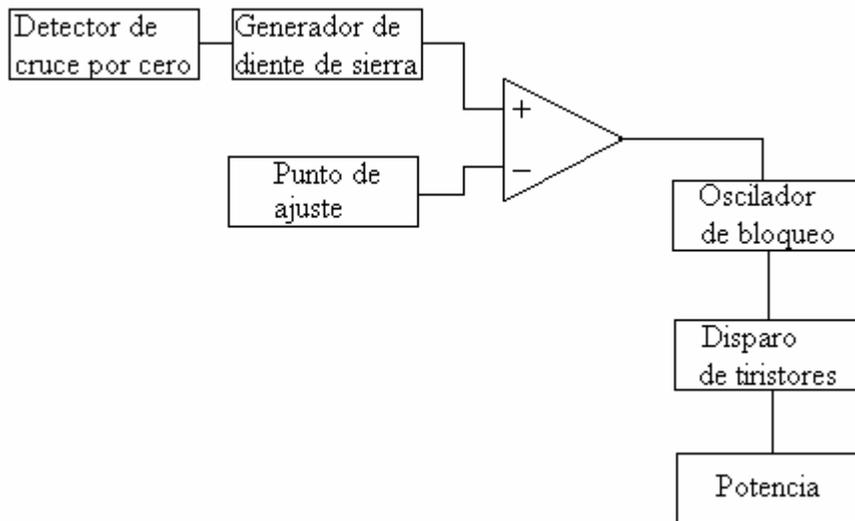


Fig. 2.3 muestra el diagrama simplificado del circuito de control de la iluminación.

2.4 La concepción del experimento.

El experimento montado persigue hacer un estudio del comportamiento de las plantas de eucalipto ante distintas condiciones ambientales. Se montó cuatro cultivos de eucalipto mostrándose en la tabla 2.1 las condiciones de cultivo.

Tabla 2.1 Caracterización de los experimentos.

Cultivo.	Concentración de CO ₂ (μmol mol ⁻¹).	FFF (μmol m ⁻² s ⁻¹)
A	350	80
B	1200	80
C	350	250
D	1200	250

Para lograr las condiciones de atmósfera enriquecida de CO₂ se utilizó el BIT mencionado anteriormente y para garantizar altos FFF se utilizaron lámparas fluorescentes y de halógeno controlando la FFF que estas emitían mediante el circuito de control explicado anteriormente.

El número de explantes por frasco fue de trece, el tiempo de inmersión tres minutos y el período de la inmersión fue cada 8 horas. Los niveles de sacarosa al 3.0% para todos los tratamientos experimentales.

Durante el desarrollo del experimento se empleó un fotoperíodo de 16 horas. La FFF, la concentración de CO₂, los niveles de realización de fotosíntesis al igual las mediciones de temperatura, concentración de CO₂, humedad relativa, FFF se midieron mediante el sistema CIRAS-2 de la firma PP-System mostrado en el anexo F.

Al finalizar la etapa de III de enraizamiento (21 días), luego de lavadas las plántulas cuidadosamente con abundante agua común, las mismas se clasificaron en tres categorías según lo establecido por Castro (2001) en base a su longitud:

- 2.0 cm. pequeñas.
- 2.1 a 3.1 cm. medianas.
- > 3.1 cm. grandes.

Al final se hizo una comparación de los niveles de realización de fotosíntesis de las plantas cultivadas *in vitro* y las que son cultivadas *ex vitro*. Para ello se tomaron plantas jóvenes de eucalipto con seis meses de edad y plantas cultivadas en ambiente *in vitro* las cuales fueron cultivadas a una concentración de 1200 μmol mol⁻¹ y un FFF de 250 μmol m⁻²s⁻¹.

2.5 Instrumento de medición CIRAS 2.

Como se ha mencionado anteriormente, todas las mediciones se hicieron con el equipo CIRAS 2 de la firma PP-System y la cubeta universal PLC6 del mismo equipo.

Este instrumento está especializado en la medición de fotosíntesis y transpiración. Para ello consta con una variedad de sensores localizados en la cubeta PLC6 los cuales con los controles implementados en el CIRAS 2 permiten realizar esta actividad. Algunos de estos sensores son:

1. Un sensor infrarrojo de temperatura adaptado en la base de la cubeta para medir la temperatura de la hoja.
2. Dos sensores, en miniatura, de FFF localizados dentro de la cubeta cerca de la superficie de la hoja.

La cubeta también ayuda a eliminar los problemas relacionados con el cálculo del área de las hojas necesario para hallar la fotosíntesis porque incluye una cámara con un área específica donde se coloca la hoja.

Existen además controles dentro de la cubeta como son:

1. Control automático de temperatura. Ayuda a mantener la temperatura de la hoja entre 10 y 25 °C ya que como hemos visto la temperatura influye en la fotosíntesis.
2. Control automático de la FFF. Esto posibilita ir ajustando los valores de la FFF desde 0 hasta 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ valores típicamente utilizados para generar automáticamente la curva de la saturación de la FFF (fotosíntesis vs. FFF). Todo lo necesario para el control esta dentro de la cubeta y no necesita de accesorios.

El equipo se encarga de trazar la gráfica de la saturación de la FFF y del CO_2 . El trazado de estas gráficas es muy lento durando aproximadamente una hora y debe hacerse antes del mediodía para evitar posibles errores. Para trazar la gráfica de saturación de la FFF se coloca en la cubeta una hoja de la planta y de forma automática se realiza la medición. Para ello la cubeta presenta lámparas las cuales va ajustando a las distintas FFF, espera un tiempo hasta que la planta se ajusta los nuevos niveles de FFF y entonces es que acepta un valor como válido. En el eje de las ordenadas tenemos los niveles de CO_2 absorbidos por la planta producto de la fotosíntesis (valores positivos) o liberados producto de la respiración (valores negativos). Después de realizada las mediciones se procede a pasar los datos para una computadora personal a través del puerto RS-232 de la computadora.

2.6 Breve resumen del capítulo.

En este capítulo estudiamos el comportamiento de las plantas en ambiente *in vitro* así como las condiciones ambientales en que se lleva a cabo este cultivo.

Se menciona que variables como humedad relativa presenta valores muy altos con respecto a los que la planta encuentra en ambiente *ex vitro* trayendo como consecuencia que la transpiración se vea disminuida en ambiente *in vitro* y cuando las plantas son llevadas a ambiente *ex vitro* mueren por la gran pérdida de agua.

Además de la humedad relativa se ve como la concentración de CO₂ y la FFF presentan niveles tan bajo en comparación con los del ambiente *ex vitro* que los dos resultan ser factores limitantes para la realización de la fotosíntesis de las plantas siendo este proceso de una gran importancia para la supervivencia de las plantas.

Se explicó más adelante, como funciona el biorreactor de inmersión temporal y los experimentos diseñados para evaluar el comportamiento de las plantas cultivadas dentro del mismo.

En el próximo capítulo se explican como se comportan las distintas variables ambientales cuando se emplean los biorreactores de inmersión temporal así como el comportamiento de la fotosíntesis, la respiración y la transpiración de las plántulas. También se darán los resultados de los experimentos realizados.

CAPÍTULO 3

3 EL COMPORTAMIENTO DE LAS PLANTAS PROPAGADAS EN LOS BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL.

En este capítulo se hace un estudio de cómo se comporta fundamentalmente la fotosíntesis de las plantas así como la respiración y la transpiración. Además se verán los resultados de la introducción de los biorreactores de inmersión temporal en la etapa III de la micropropagación analizando el tamaño alcanzado por las plantas propagadas.

3.1 Comportamiento de las variables con el uso de los biorreactores de inmersión temporal.

El empleo de los biorreactores de inmersión temporal dentro de la etapa III en la micropropagación contribuye a acercar más las condiciones *in vitro* a las condiciones *ex vitro*. Esta es la ventaja fundamental de los biorreactores de inmersión temporal lo que tributa a una mejor adaptación de las plántulas cuando pasan a la etapa IV donde se adaptan a las condiciones ambientales reales.

3.1.1 La composición del medio.

En los experimentos se utilizó un 3.0% de sacarosa en el medio de cultivo lo cual atentó con la posibilidad de que las plantas tuvieran un mayor comportamiento fotomixotrófico con tendencias al autotrofismo. En teoría con una menor concentración de sacarosa en el medio de cultivo se deben obtener mayores niveles de realización de fotosíntesis y como beneficio adicional una disminución de la contaminación ya que la sacarosa en el medio de cultivo tiende a aumentar la contaminación y por tanto la pérdida de frascos de cultivo.

3.1.2 La iluminación.

Con la introducción del circuito que posibilita controlar la FFF se logra aumentar dicha variable. En estos momentos se vuelve un factor menos limitante para la realización de la fotosíntesis y por tanto permite un mejor desarrollo y mayor crecimiento de las plántulas como se mostrará más adelante. Una mayor realización de fotosíntesis y por ende una

mayor fijación de CO₂ siempre traerá unido un aumento del tamaño de las plantas ya que ese CO₂ fijado pasa a formar parte del cuerpo de la planta. La única inconveniencia de este aumento es con relación al incremento de la temperatura hasta 27 °C lo que no permitió que se hiciera el cultivo a una mayor FFF como 300 μmol m⁻² s⁻¹ o hasta cerca del punto de saturación (600 μmol m⁻² s⁻¹). Es valido aclarar que este punto para el cual se satura no debe ser sobrepasado porque entonces empezaría a ocurrir un proceso irreversible para las plantas que conduce a la muerte de las mismas. Este proceso es la fotoinhibición.

La fotoinhibición ocurre producto de que se produce más energía en la fase luminosa de la que se puede utilizar para la asimilación del CO₂ y por tanto este aumento de energía hace que se destruyan los mecanismos que actúan en la fotosíntesis. Este proceso no es visible al momento sino que se hace visible con el tiempo y lo podemos ver porque las hojas se tornan amarillas y la planta muere.

3.1.3 La concentración de CO₂.

El cultivo se encuentra, como hemos visto, la mayor parte del tiempo, en una atmósfera que presenta la concentración de CO₂ que se desee. El botellón de CO₂ es el encargado de lograr concentraciones de CO₂ por encima de las 350 ppm llegando hasta 1200 ppm. La fotosíntesis que realizan las plantas tiende a consumir el CO₂ que se encuentra dentro del frasco de cultivo, por tanto, para lograr mantener la concentración de CO₂ constante se bombea aire constantemente dentro del frasco de cultivo cuando no están sumergidas en el medio de cultivo. La ventaja de esto es que nunca se produce un balance negativo de CO₂ en el crecimiento de las plantas, teniendo las mismas el CO₂ necesario para la realización de la fotosíntesis.

3.1.4 La humedad relativa.

Para analizar el comportamiento de la humedad relativa hay que ver que sucede en dos momentos diferentes. En el momento en que las plantas están sumergidas en el medio de cultivo la humedad relativa como es de esperar está al 100%. Sin embargo, el mayor tiempo y cuando las plántulas están rodeadas solo del aire la humedad relativa disminuye como promedio hasta cerca del 89% aproximadamente.

3.1.5 La temperatura.

En este caso con el aumento de la FFF en ciertos experimentos se registro un pequeño aumento de la temperatura a 27 °C dentro del estante donde se encontraban los frascos de cultivo. En el momento de aumentar la FFF debemos introducir un sistema de refrigeración para controlar la temperatura. El aumento de la temperatura fue el factor que impidió que los cultivos se pudieran iluminar con una FFF mucho mayor.

3.1.6 La circulación del aire.

En el sistema ocurre que aumenta la circulación del aire en el momento que no se está sumergido en líquido. Esto es importantísimo para mejorar el comportamiento de las plantas en ambiente *in vitro* porque se produce un mayor desplazamiento de las moléculas de agua liberadas por la transpiración que antes quedaban cerca de los estomas contribuyendo a que existiera un bajo potencial hídrico. Ahora, al existir menos agua en los alrededores de los estomas aumenta el potencial hídrico de las células lo que permite una mayor transpiración y por tanto la planta desarrolla los mecanismos vinculados al control de la transpiración. Esto trae como consecuencia una mejor adaptación en la etapa IV con una disminución del tiempo de estancia en esa etapa y un alto porcentaje de supervivencia ya que disminuyen las pérdidas de plantas por deshidratación.

3.1.7 La fotosíntesis.

La fotosíntesis que realizan las plantas en los biorreactores de inmersión temporal se ha comportado de distintas formas en correspondencia con las condiciones de iluminación y de concentración de CO₂ con que se cultivaron las plantas.

El comportamiento de la fotosíntesis cuando terminó la etapa III se puede analizar mediante el estudio de las curva de saturación a la luz que se muestran en la fig. 3.1.

En el experimento A, donde la concentración de CO₂ estuvo igual a la concentración del ambiente, el FFF es un factor limitante para el desarrollo de la actividad fotosintética quedándose, la capacidad de realizar fotosíntesis, por debajo de los demás experimentos. Esto es debido a que no se produce el ATP necesario en la fase luminosa para ser utilizado en la fase oscura en el ciclo de Calvin y asimilar el CO₂ atmosférico.

En el experimento B se pudo verificar un pequeño aumento de la fotosíntesis producto de que la concentración de CO₂ en el ambiente fue mucho mayor a la que existía en el

experimento A. La fotosíntesis fue restringida en esta ocasión por la débil iluminación con que se cultivaron las plantas.

El experimento C arrojó que al aumentar la iluminación manteniendo la concentración de CO_2 en los niveles de la atmósfera la actividad fotosintética de las plantas tuvo un aumento considerable pero otra vez se vio restringida por una variable ambiental. En este caso fue la concentración de CO_2 la que propició la restricción a la actividad fotosintética.

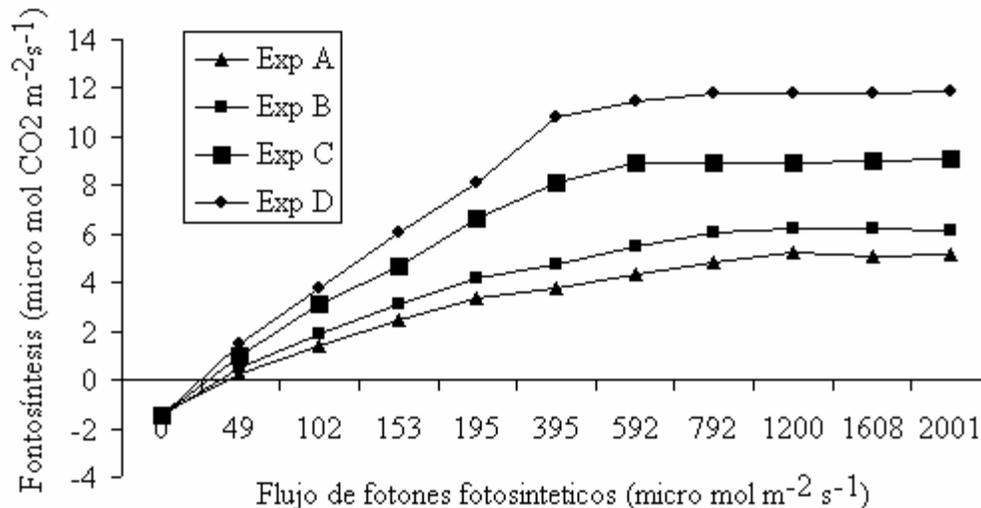


Fig. 3.1 Curva de saturación de la luz para los distintos experimentos. Las condiciones de los experimentos se muestran en la tabla 2.1.

En el experimento D, donde las condiciones ambientales de concentración de CO_2 y FFF fueron mayores con respecto a los restantes experimentos, la actividad fotosintética fue superior en todos los casos. Esto estuvo dado ya que las limitaciones impuestas por las variables ambientales de concentración de CO_2 e iluminación fueron menores que en los demás experimentos propiciando un comportamiento más autotrófico con una mayor realización de fotosíntesis.

Como podemos ver se demuestra la posibilidad de actuar sobre la fotosíntesis mediante el control de las distintas variables ambientales con que se cultivan las plantas.

3.1.8 La transpiración.

Con la utilización de los biorreactores de inmersión temporal se debe aumentar en teoría la transpiración en las plantas. Cuando las plantas no están bañadas, que es el mayor tiempo, ocurre que disminuye la humedad relativa y el potencial hídrico se ve aumentado favoreciendo el aumento de la transpiración en ese momento y por tanto los mecanismos

vinculados a la transpiración van perfeccionándose para evitar que cuando sean llevadas a la aclimatización mueran producto de la deshidratación. Estos valores no pudieron ser medidos.

3.1.9 La respiración.

Con la introducción de los biorreactores de inmersión temporal no ocurren cambios significativos en la respiración de las plántulas. Esto es debido a que no hay escasez de sustrato respiratorio ya que las plántulas lo obtienen ya sea mantienen mediante la fotosíntesis o mediante la absorción del medio de cultivo de glucosas. El único cambio que ocurre y no es de gran importancia es que se puede enriquecer el ambiente de CO₂ al llevar la concentración de CO₂ a 1200 ppm en dos de los experimentos contribuyendo a que disminuya la concentración de O₂ dentro del frasco de cultivo. Ese aumento de la concentración de CO₂ hace que la misma ahora sea de 0.12% en vez de 0.035% que existía anteriormente, sin embargo la concentración de O₂ disminuye solo del 21% al 20% aproximadamente, siendo este cambio entonces muy pequeño como para que haya una disminución considerable de la respiración en comparación con el cambio que experimentó la concentración de CO₂.

3.1.10 Otras variables.

En este epígrafe se introducen otras variables que permiten conocer el grado de crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas variables tendrán mayor o menor peso en dependencia de la especie que se estudie. Las nuevas variables que dan una medida de la calidad de las plantas son:

1. Tamaño.
2. Largo de las raíces.
3. Área de las hojas.
4. Color de las hojas.
5. Grosor del tallo.
6. Masa seca⁽¹⁾.
7. Masa fresca⁽²⁾.

¹ La masa seca se calcula después de haber secado y triturado la planta en hornos destinado para tales efectos.

² La masa fresca se calcula a partir de la planta viva.

Para cada especie en estudio puede que una o varias de estas sean de mayor importancia y para otras especies puede que no sean tan determinantes como ejemplo tenemos las especies de plátano, boniato y el tabaco donde lo determinante es el grosor del tallo, el largo de las raíces y el área de las hojas respectivamente.

Para nuestro caso particular, el eucalipto, lo más importante es el tamaño que han alcanzado las plantas para ser consideradas como plantas competentes. El término plantas competentes se refiere a aquellas plantas que por sus condiciones tienen altas posibilidades de sobrevivir en ambiente *ex vitro*. En este trabajo se consideran plantas competentes aquellas que están clasificadas entre plántulas grandes y plántulas medianas.

3.2 Determinación del tamaño de las plantas propagadas en los biorreactores de inmersión temporal.

Los resultados que se observan en la fig. 3.2 muestran el comportamiento del tamaño de las plántulas de eucalipto propagadas en los biorreactores de inmersión temporal bajo distintas condiciones ambientales.

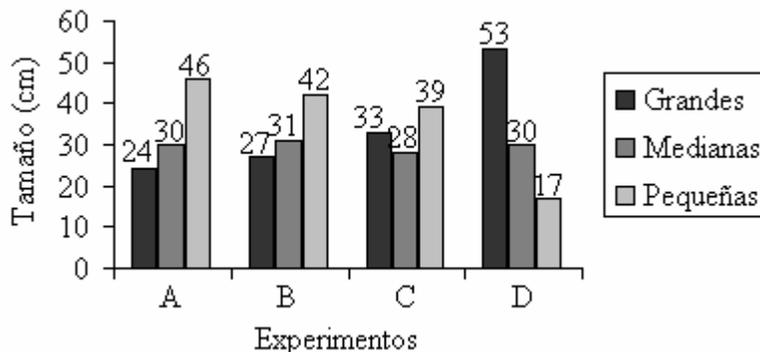


Fig. 3.2 tamaño de las plantas propagadas en los biorreactores de inmersión temporal.

En la fig. 3.2 se observa que los mayores porcentajes de plántulas competentes para la aclimatización se obtienen en aquellos tratamientos con altos niveles de iluminación y altas concentraciones de CO₂. La combinación del experimento D fue el que más plantas competentes aportó con un 83%. Lo contrario sucedió en los tratamientos con bajos niveles iluminación y de baja concentración de CO₂ como el experimento A, donde el porcentaje de plántulas competentes fue de 54%. Este porcentaje es una muestra de la importancia de lo que significaría la introducción masiva de este sistema porque si anteriormente en el cultivo *in vitro* tradicional se obtenían solo un 25 a 30% de plantas competentes ahora este valor se

ha duplicado y hasta triplicado con solo aumentar las concentraciones de CO_2 y la iluminación.

Se puede observar la importancia que tiene la iluminación con que se hayan cultivado las plántulas. Comparando el experimento B y C donde se obtienen un 58% y un 61% respectivamente de plantas competentes.

3.3 Comparación entre los niveles de realización de fotosíntesis *in vitro* y *ex vitro*.

En la fig. 3.3 se puede observar la actividad fotosintética en la gráfica de saturación de a luz en plantas cultivadas en casa de cultivo con 6 meses de edad y plántulas crecidas en condiciones *in vitro* utilizando los biorreactores de inmersión temporal.

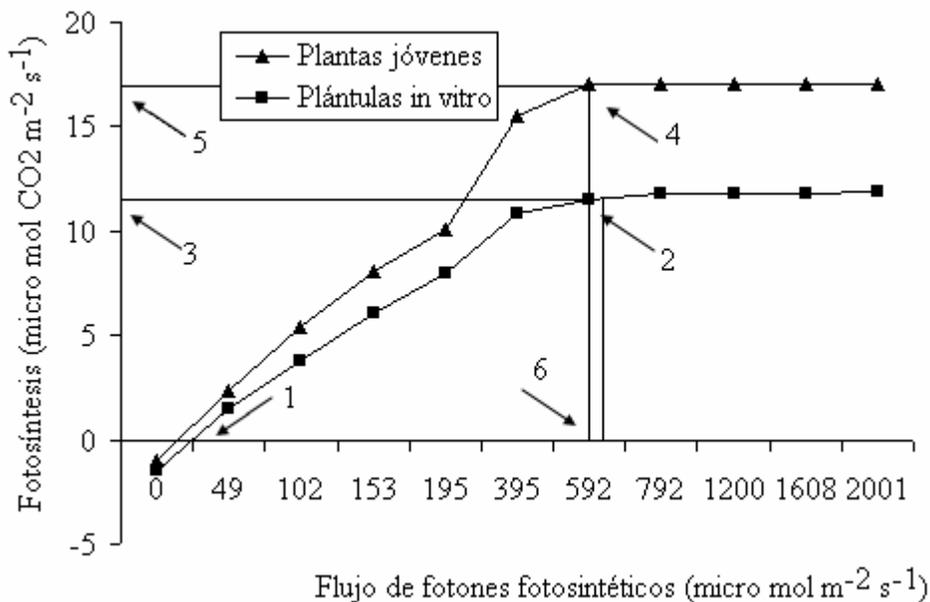


Fig. 3.3. Curvas de saturación a la luz de la evolución fotosintética de CO_2 (CO_2 350 ppm, temperatura 25°C) en plántulas de eucalipto *in vitro* y con plantas jóvenes. 1- punto de compensación de la luz; 2- punto de saturación de plántulas *in vitro*; 3- capacidad fotosintética máxima en plantas *in vitro*; 4- punto de saturación de plantas adultas; 5- capacidad fotosintética máxima en plantas jóvenes y 6- FFF necesarios para alcanzar la saturación de la luz.

En la fig. 3.3 se puede observar como las plantas jóvenes alcanzan los más altos valores de realización fotosintética $17.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que en las plántulas *in vitro* el máximo de actividad fotosintética fue de $11.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por otro lado, el punto de compensación de la luz (donde la fotosíntesis = respiración) en ambos estados es muy similar ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), así como los puntos de saturación de la luz en ambos estadios de

desarrollo, los cuales fueron muy cercanos a los $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que indica la adaptación del aparato fotosintético en las plántulas *in vitro*. Es conocido que el punto en que cada especie alcanza la saturación es para una misma FFF, es decir, cada especie se satura con una FFF que es característico de la especie aunque las plantas cultivadas *in vitro* presentan un pequeño corrimiento.

Los resultados alcanzados demuestran que las plantas *in vitro* presentan una diferencias en cuanto a la capacidad fotosintética máxima que registraron ambos grupos de plantas, presumiblemente por las razones antes expuestas.

Es deseado que las plantas cultivadas *in vitro* presenten niveles de realización de fotosíntesis similar a los niveles que realizan las plantas cultivadas en ambiente *ex vitro* con el objetivo de garantizar un crecimiento y desarrollo que al final redunde en una disminución de los desórdenes mencionados en el primer capítulo. Esto garantizaría un mayor porcentaje de supervivencia de las plántulas a ser llevadas a la etapa IV de aclimatización *ex vitro*.

3.4 Breve resumen del capítulo.

Este capítulo es el más importante porque en el se analizan los efectos producidos sobre las plántulas por los biorreactores de inmersión temporal. Además se estudia el comportamiento de las variables ambientales y sus efectos sobre procesos de vital importancia para la supervivencia de plantas en el cultivo de eucalipto.

Se muestra, según los resultados que las plantas cultivadas a altas FFF y altas concentraciones de CO_2 presentan un mayor crecimiento y mayores niveles de realización de fotosíntesis lo que las acerca más a las plantas cultivadas en ambiente *ex vitro*. Estos aumentos son en un rango determinado porque una FFF muy por encima del punto de saturación podría traer daños irreparables como la fotoinhibición que provocaría la muerte de las plantas.

Además en condiciones de baja FFF y bajas concentraciones de CO_2 se obtuvieron un mayor porcentaje de plantas competentes que sin el empleo de los biorreactores de inmersión temporal lo que da una importancia del empleo de este método de cultivo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

La micropropagación es una biotecnología que se ve favorecida por el empleo de los biorreactores de inmersión temporal obteniendo resultados muy satisfactorios en cuanto al porcentaje de supervivencia de las plantas y la calidad de las mismas.

Se analizaron las ventajas y las desventajas de la misma siendo los desórdenes que presentan las plantas, producto de las condiciones ambientales de cultivo, la principal causa de los altos porcentajes de muertes en el proceso de adaptación de las plantas a la vida en las casas de cultivo. La humedad relativa y la concentración de azúcares en el medio de cultivo son las variables ambientales que más influyen en dichos desórdenes.

Las plantas dependen de la respiración, la transpiración y la fotosíntesis principalmente para sobrevivir cuando son llevadas a las casas de cultivo por tanto se analizaron los factores ambientales que más influyen en la realización de estos procesos en el ambiente *ex vitro* para comprender posteriormente que ocurre en el ambiente *in vitro* y en los biorreactores de inmersión temporal.

Se menciona que en ambiente *in vitro* la humedad relativa presenta valores muy altos con respecto a los que las plantas encuentran en ambiente *ex vitro* trayendo como consecuencia que la transpiración se vea disminuida en ambiente *in vitro* y cuando las plantas son llevadas a ambiente *ex vitro* mueren por deshidratación.

Además la concentración de CO₂ y la FFF presentan niveles tan bajos en comparación con los que se alcanzan en ambiente *ex vitro* que los dos son factores limitantes para la realización de la fotosíntesis siendo este proceso determinante para la supervivencia de las plantas en ambiente *ex vitro*.

Según los resultados, las plantas cultivadas a altas FFF y altas concentraciones de CO₂ presentan un mayor crecimiento y mayores niveles de realización de fotosíntesis lo que las acerca más a las plantas cultivadas en ambiente *ex vitro*. Se debe tener cuidado hasta que valores aumentar la FFF para evitar la fotoinhibición.

Además en condiciones de baja FFF y bajas concentraciones de CO₂ se obtuvieron un mayor porcentaje de plantas competentes que sin el empleo de los biorreactores de inmersión temporal lo que da una importancia del empleo de este método de cultivo.

Se demostró que los biorreactores de inmersión temporal son de gran importancia ya que ellos se introducen un nuevo campo que es la experimentación sobre la base de la modificación de las condiciones ambientales en que se cultivan las plantas para obtener una mayor producción de vitroplantas.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES.

Para finalizar podemos recomendar para trabajos futuros:

1. Realizar estudios más profundos de la influencia de la luz en la fotosíntesis, como el caso de que la luz sea pulsante y a determinadas frecuencias.
2. Realizar estudios disminuyendo la concentración de sacarosa hasta un 1% y hasta 0% con vistas a lograr un comportamiento puramente autotrófico.
3. Introducir un sistema de refrigeración que permita una mayor iluminación manteniendo la temperatura sobre los 25 °C.
4. Se hagan estudios relacionados con el ultrasonido y su posible influencia en el crecimiento y desarrollo de las raíces y los tallos.
5. Realizar el montaje de más biorreactores de inmersión temporal en el Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila y que este sea usado de forma masiva en la propagación de plantas de eucalipto.
6. Se perfeccione el sistema montado añadiéndole sensores de iluminación, concentración de CO₂, temperatura, humedad relativa y presión para poder hacer un análisis más detallado en el tiempo de cada una de estas variables.
7. Se estudie el comportamiento de la fotosíntesis, la respiración y la transpiración en otras especies y así poderlas propagar utilizando la técnica del biorreactor de inmersión temporal.

*REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [Aceves y Hernández, 1997] José Luis Aceves Rubio y Jacinto Hernández Hernández, Universidad Veracruzana. (1997). Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo in vitro de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad, <http://www.uv.mx/iiesca/revista2/aceves2.html>, 20 de mayo de 2004.
- [Cassells, 1991] Allan C. Cassells (1991). Control of contamination in automated plant propagation, En: *Scale-Up and automation in plant propagation*. 1, 4, I. K. Vasil (Ed.), Advisory Board, Florida, EUA.
- [Castro y González, 2000] Dagoberto Castro R. y Justo González Olmedo, Universidad Católica de Oriente, Universidad de Ciego de Avila (2000). *Micropropagación de Eucalipto (Eucalyptus grandis Hill ex Maiden) en el sistema de inversion temporal*. <http://www.inia.cl/at/espanol/v62n1/ART07.htm>. 25 de mayo de 2004.
- [Castro, 2001] Dagoberto Castro 2001. *Propagación mixotrófica de E. grandis Hill ex Maiden en BIT*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.
- [Cazzulino y col., 1991] Dana Cazzulino, Henrik Pedersen y Chee-Kok Chin (1991). Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation, En: *Scale-Up and automation in plant propagation*. 1, 4, I. K. Vasil (Ed.), Advisory Board, Florida, EUA.
- [Fujita y Kinase, 1991] Nobuyuki Fujita y Atsushi Kinase (1991). The use of robotic in automated plant propagation, En: *Scale-Up and automation in plant propagation*. 1, 4, I. K. Vasil (Ed.), Advisory Board, Florida, EUA.
- [Murai y col., 1992] Y. Murai, Chieri Kubota y Toyoki Kosai (1992). Culture medium volume as a factor affecting changes with time in concentrations of medium components and growth of plantlets in vitro, En: *Environmental control in micropropagation* Vol. 2. Chieri Kubota (Ed.). Chiba, Japón.
- [Fujiwara y Kosai., 1994a] Kazuhiro Fujiwara y Toyoki Kosai (1994). Physical microenvironment and its effects, En: *Environmental control in micropropagation* Vol. 3. T. Kosai, Y. Kitaya y C. Kubota (Eds.). Chiba, Japón.

- [Fujiwara y Kosai., 1994b] Kazuhiro Fujiwara y Toyoki Kosai (1994). Physical microenvironment and its effects, En: *Environmental control in micropropagation* Vol. 3. T. Kosai, Y. Kitaya y C. Kubota (Eds.). Chiba, Japón.
- [George, 1993] Edwin F. George (1993). Factors affecting growth and morphogenesis, En: *Plant propagation by tissue cultura*, 2, 7, Exegetics Limited, Edington, England.
- [González, 2003] Justo González Olmedo (2003). *Comunicación personal*. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.
- [González, 2004a] Justo González O. (2004). *Comunicación personal*. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.
- [González, 2004b] Justo González O. (2004). *Comunicación personal*. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.
- [Gupta y col, 1991] Pramond K. Gupta, Roger Timmis, Gerald. Pullman, Mike Yancey, Mary Kreitinger, William Carlson y Carolyn Carpenter (1991). Development o fan embriogenia system for automated propagation of forrest trees, En: *Scale-Up and automation in plant propagation*. 1, 4, I. K. Vasil (Ed.), Advisory Board, Florida, EUA.
- [Kirdmanee y col., 1994] C. Kirdmanee, Y. Kitaya y Toyoki Kosai (1994). Rapid acclimatization of *in vitro* plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity *ex vitro*. En: *Environmental control in micropropagation* Vol. 3. T. Kosai, Y. Kitaya y C. Kubota (Eds.). Chiba, Japón.
- [Kirdmanee y col., 1995] C. Kirdmanee, Y. Kitaya y Toyoki Kosai (1995). Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*, En: *Environmental control in micropropagation* Vol. 3. T. Kosai, Y. Kitaya y C. Kubota (Eds.). Chiba, Japón.
- [Kitaya y col., 1998] Y Kitaya, T. Shibuya y Toyoki Kosai (1998). Effects of light intensity anda ir velocity on air temperatura, water vapor pressure and CO₂ concentration inside a plant canopy under an artificial lighting condition, En: *Collected papers on environmental effects and their control in plant propagation and transplant production* Vol. 1. Michiko Abe (Ed.). Chiba Japón.
- [Kosai y col., 1986] Toyoki Kosai, Kazuhiro Fujiwara y Ichiro Watanabe (1986) Relation between the culture mediun composition and water potencial of liquid culture media,

- En: *Enviromental control in micropropagation* Vol. 1. Byoung Ryong Jeong (Ed.). Chiva, Japón.
- [Kurtz y col., 1991a] Sharon L. Kurtz, Roberto D. Hartman y Irwin Y. E. Chu (1991). Current methods of commercial micropropagation, En: *Scale-Up and automation in plant propagation*. 1, 2, I. K. Vasil (Ed.), Advisory Board, Florida, EUA.
- [Kurtz y col., 1991b] Sharon L. Kurtz, Roberto D. Hartman y Irwin Y. E. Chu (1991). Current methods of commercial micropropagation, En: *Scale-Up and automation in plant propagation*. 1, 2, I. K. Vasil (Ed.), Advisory Board, Florida, EUA.
- [Sagawa y Kunisaki, 1990a] Y. Sagawa y J. T. Kunisaki (1990). Micropropagation of floricultura crops, En: *Handbook of plant cell culture*. 1, 3, P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, Y. P. S. Bajaj (Eds.), McGraw-Hill, Nueva York, EUA.
- [Sagawa y Kunisaki, 1990b] Y. Sagawa y J. T. Kunisaki (1990). Micropropagation of floricultura crops, En: *Handbook of plant cell culture*. 1, 3, P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, Y. P. S. Bajaj (Eds.), McGraw-Hill, Nueva York, EUA.
- [Vázquez y Torres, 1981] E. Vázquez Vacall y S. Torres García (1981). *Fisiología Vegetal*. 1, Pueblo y Educación, Ciudad de la Habana, Cuba.

ANEXOS

ANEXOS.

A Glosario.

ADP: Adenosín-difosfato.

FFF: Densidad del flujo de fotones fotosintéticamente activo. El flujo de fotones fotosintéticamente activo es el que se encuentra entre 400 y 700 nm de longitud de onda.

ATP: Trifosfato de adenosina.

NADPH₂: NADP reducido.

FD: Ferredoxina.

FADH₂: FAD reducido.

FMN: Flavinmononucleótido.

FAD: Flavín-adenín-dinucleótido.

PC: Plastocianina.

PQ: Plastoquinona.

NADP: Fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido.

AGP: Ácido 3-fosfoglicérico.

GAP: gliceraldeihido-3-fosfato.

Pi: Fosfato inorgánico.

B Frascos de cultivo.

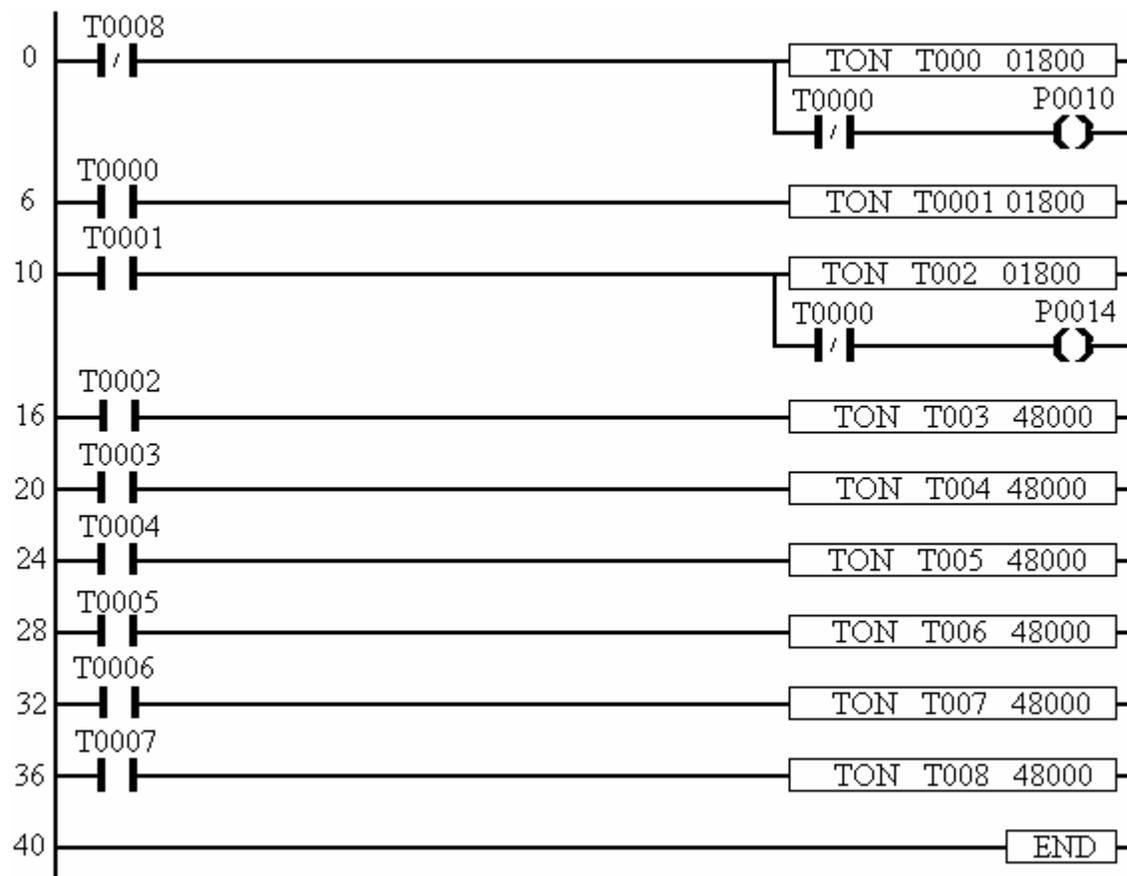


C Automata y su programa.

Automata



Programa



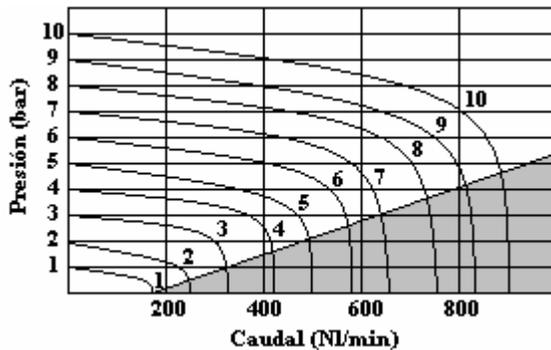
D Válvula tipo SMC SY5420-5DZ-01F.

Forma de pedido

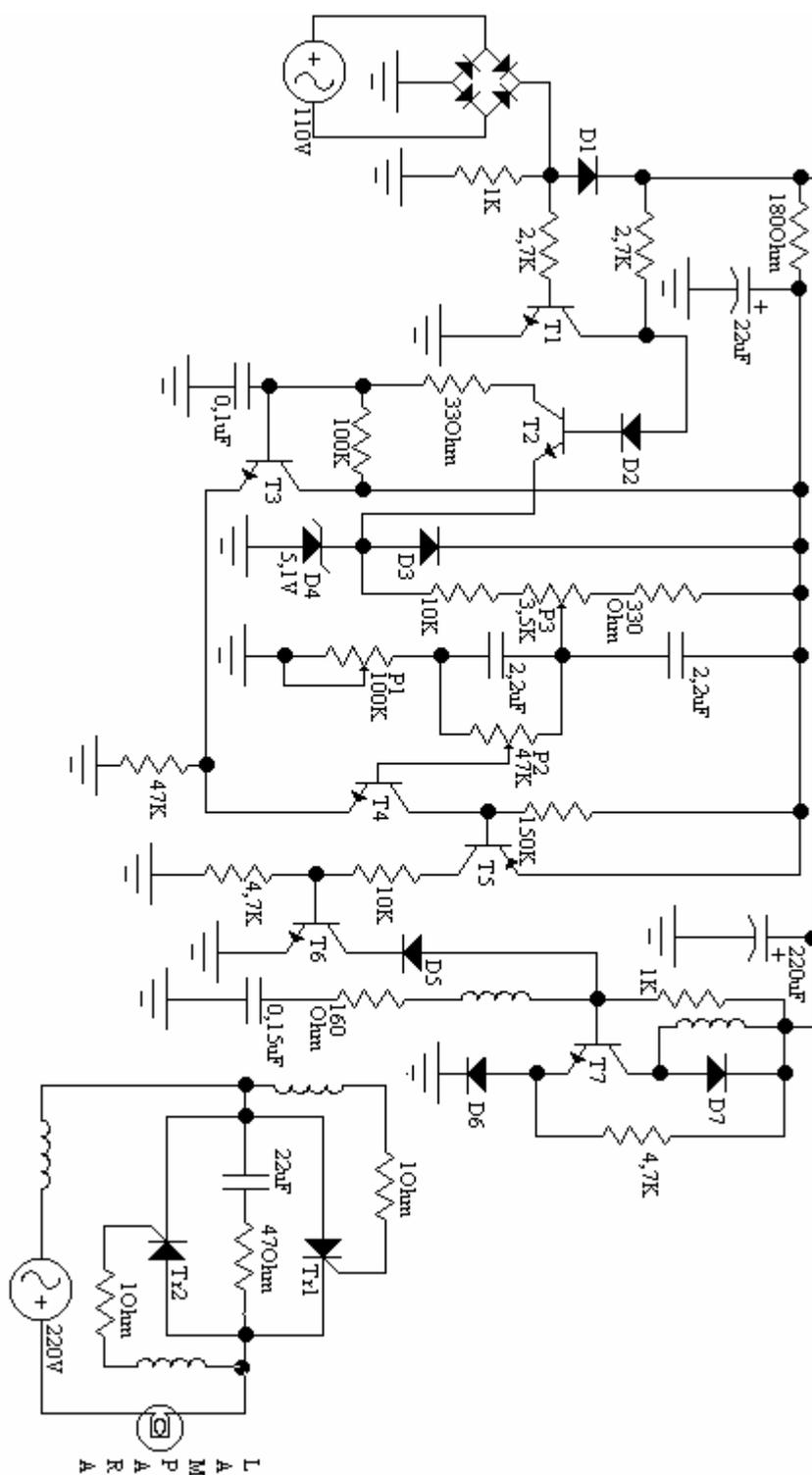
Accionamiento manual.	Tipo de válvula y función.	Símbolo.	Voltaje.	Salidas.	Caudal (*) (Factor Cv).
Accionamiento manual por pulsador sin enclavamiento.	5/3 centro a escape.		24 Vcc.	Roscadas G1/8.	412 NI/min. (0.42)

(*) Los datos de caudal se dan a una presión de alimentación de 6 bar y con una caída de presión de 1 bar al paso por la válvula.

Curvas de caudal.



E Circuito para el control de la FFF.



F Instrumento de medición CIRAS 2

