



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS



Título

Incremento de la eficiencia en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*) en sistemas de inmersión temporal



TESIS EN OPCION AL TITULO ACADEMICO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Autor: Ing. Jorge L. Montes de Oca Suárez

Tutor: Dr C. Elio A. Jiménez González

Consultante: Dra. Novisel Veitía Rodríguez

Santa Clara, CUBA

2010

Agradecimientos

Agradecimientos

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a:

- *Al Dr. Elio Jiménez por la dirección de esta tesis y dedicarme parte de su preciado tiempo.*
- *A la Dra. Novisel Veitia por ayudarme en toda la etapa de análisis estadísticos y desarrollo de este trabajo.*
- *A Lidia Martínez por ayudarme en el desarrollo de este trabajo.*
- *Al Instituto de Biotecnología de las Plantas por contribuir a mi formación profesional.*
- *A mi esposa e hijos por soportar todos mis malos ratos y ayudarme a superarlos.*
- *En especial, a mi madre por su amor y apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.*
- *A los integrantes de la Biofábrica de la ETICA por estar siempre al tanto de mi trabajo.*
- *A todas las personas, tanto del IBP como de la ETICA, que colaboraron e hicieron posible la realización de esta tesis.*

A todos, muchas Gracias

Resumen

RESUMEN.

El presente trabajo tuvo como finalidad mejorar la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*) en sistemas de inmersión temporal. Para ello se realizaron una serie de experimentos donde se estudió la influencia de la presión de aire en los SIT sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas *in vitro*, la posibilidad de eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT, y el efecto combinado de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo. De estos estudios se obtuvo que en la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo) se lograra un mejor desarrollo morfológico de las plantas y un incremento en los coeficientes de multiplicación, lo que también se reflejó en una mayor sobrevivencia de las plantas cuando son trasplantadas a la fase de aclimatización. Igualmente se demostró que es posible eliminar la fase de elongación realizando el último subcultivo de multiplicación en un medio sin adicionar PBZ, lo que permite reducir el tiempo en el esquema de propagación y a la vez incrementar la calidad de las plantas producidas. Con la combinación de la densidad de inóculo de 40 brotes por vaso de cultivo y un tiempo de cultivo de 50 días se logra una mejor utilización de la capacidad del vaso de cultivo y la producción de un mayor número de plantas por SIT, que en términos productivos significa un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada, permitiendo manejar un mayor número de explantes por área física de las cámaras de cultivo. El escalado productivo en 3 genotipos de caña de azúcar realizado en la Biofábrica de Caña de Azúcar perteneciente al Ingenio Santa Ana en la República de Guatemala, en la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Cuba) y en la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez”, perteneciente al Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste, Pernambuco, Brasil, validó los resultados obtenidos en la presente investigación.

indice

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	La caña de azúcar. Generalidades.....	4
2.2	Técnicas de propagación de la caña de azúcar.....	5
2.3	Cultivo <i>in vitro</i> en caña de azúcar.....	6
2.4	Embriogénesis somática.....	7
2.5	Automatización de la micropropagación (SIT).....	8
2.6	Sistemas de Inmersión Temporal en la caña de azúcar.....	11
2.7	Utilización de reguladores del crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i>	13
2.8	Retardantes del crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i> de la caña de azúcar.....	14
2.9	Influencia del ambiente <i>in vitro</i> en el proceso morfogénico de la propagación en los sistemas de inmersión temporal.....	15
2.10	Influencia de la propagación <i>in vitro</i> en el rendimiento agrícola.....	16
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.0	Procedimientos generales de cultivo <i>in vitro</i>	19
3.1	Influencia de la presión de aire en los SIT sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas <i>in vitro</i>	23
3.2	Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT.....	25
3.3	Efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo.....	27
3.4	Escalado de la propagación en los SIT en 3 genotipos de caña de azúcar.....	29
3.5	Estudio en campo de plantas propagadas en los SIT en 3 genotipos de caña de azúcar.....	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1	Influencia de la presión de aire en los S.I.T. sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas <i>in vitro</i>	32

4.2	Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT.....	37
4.3	Efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo.....	42
4.4	Escalado de la propagación en sistemas de inmersión temporal en 3 genotipos de caña de azúcar.....	46
4.5	Comportamiento en campo de las plantas cultivadas <i>in vitro</i> en relación con la forma de cultivo tradicional.....	51
5.	CONCLUSIONES.....	55
6.	RECOMENDACIONES.....	57
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

Introducción

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum sp. híbrido*) es el principal cultivo económico de muchos países. Se encuentra entre los diez primeros para la producción de alimento y proporciona entre el 60 y 70 % del azúcar que se elabora mundialmente (Ahlfeld, 1996). Su cultivo en Cuba representó el principal producto agrícola e industrial y fuente fundamental de riquezas, al cual se le llegó a dedicar 1.5 millones de hectáreas, el 40 % del área total cultivada (Anónimo, 2000). Pero después del año 2002 la situación varió; según Rivera (2004) se redujo la cantidad de tierras dedicadas al cultivo y se concentró en los suelos más productivos, existiendo alrededor de 820 000 hectáreas para su plantación.

Los procedimientos de cultivo actuales presentan dificultades para la obtención de semilla de caña de azúcar. Los métodos de propagación convencionales por estacas son lentos y para propagar las nuevas variedades comerciales, el tiempo que media entre la selección y la multiplicación es de más de 10 años (González *et al.*, 2004 y 2006; Jorge *et al.*, 2002). En Cuba el proceso de producción de semilla comercial es de 32 - 36 meses, desde que se planta como semilla básica, hasta que se cosecha como certificada (González *et al.*, 2008).

Por otra parte, las enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los principales factores negativos para la producción azucarera en Cuba y el mundo. Durante los últimos años ha crecido considerablemente el número de organismos patógenos y agentes etiológicos detectados sobre este cultivo. Por tal motivo es de suma importancia dominar y resolver la situación fitosanitaria de las plantaciones cañeras para estar en condiciones de prevenir o reducir las pérdidas ocasionadas por enfermedades en las cosechas (Chinea *et al.*, 2000).

Han sido varios los métodos de propagación desarrollados como: Seblang, Rayungan, yemas aisladas, Jieblock, estacas de una sola yema, todos buscan acortar el tiempo que media entre la obtención de una variedad y su explotación comercial (Pérez y Rodríguez, 1987), pero aún no han logrado dar una respuesta satisfactoria pues presentan bajos coeficientes de multiplicación y requieren de la utilización de grandes áreas.

La micropropagación a través del cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos para el cultivo de la caña de azúcar ha demostrado ser una importante alternativa y una herramienta de gran beneficio para la producción de semillas de calidad, la introducción de nuevas

variedades o la renovación rápida por otras ante problemas sanitarios, proporcionando una solución más eficiente a las dificultades que presentan los métodos convencionales con los coeficientes de multiplicación, el tiempo necesario para la introducción de nuevas variedades y la incidencia de las enfermedades en los rendimientos agrícolas (Pérez *et al.*, 1996; Evans, 1986; Anderlini y Kotska, 1986; Peros y Bonnel, 1990; Jackson *et al.*, 1990; Flynn y Anderlini, 1990; Jiménez 1995 y Pérez, 1998; Lorenzo *et al.*, 1998; Orellana, 1994; Freire, 2001).

No obstante a estas ventajas el proceso de propagación vía organogénesis presenta algunas limitantes que repercuten directamente en el aumento de los costos de producción, dado por el elevado número de operaciones manuales y los bajos coeficientes de multiplicación (Jiménez y De Feria, 1998). La utilización de medios de cultivo en estado líquido en la micropropagación puede reducir la manipulación y los costos en la propagación *in vitro* (Teisson y Alvard, 1994; Aitken-Christie *et al.*, 1995; Teisson *et al.*, 1996).

Estas razones hacen necesario el desarrollo de sistemas de producción más eficientes basados en la automatización (Lorenzo *et al.*, 1999; de Feria *et al.*, 1998; Bernal *et al.*, 2002). La automatización reduce los costos de producción, disminuye la manipulación del material vegetal por el hombre, aumenta la eficiencia biológica y productiva de las plantas propagadas (Escalona *et al.*, 2003).

Sistemas semiautomatizados basados en el principio de la inmersión temporal han permitido reducir los efectos colaterales ocasionados por los medios de cultivo líquido estáticos, como son la hiperhidricidad e hipoxia (Alvard *et al.*, 1993; Escalona *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 1999; Eltenne y Berthouly, 2002), brindando la posibilidad de controlar las propiedades químicas y físicas en el ambiente de los recipientes de cultivo (Cejas *et al.*, 2005).

Su uso ha permitido alcanzar grandes niveles de proliferación durante la etapa de multiplicación en varias especies de plantas (Eitenne y Berthouly, 2002) y entre ellas la caña de azúcar (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1994; Jiménez, 1995; Lorenzo *et al.*, 1998; de Feria *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1998; Escalona *et al.*, 1998; Bernal *et al.*, 2002; Etienne *et al.*, 2002; Posada *et al.*, 2003, Mordocco *et al.*, 2008).

El protocolo propuesto por Lorenzo *et al.* (1998), establece el uso del Paclobutrazol (PBZ) en la fase de multiplicación en los SIT para estimular la formación de clusters de brotes compactos, lo que requiere de una fase de elongación en un medio que contiene AG₃ en previa al enraizamiento. Con este procedimiento se ha logrado el incremento de los coeficientes de multiplicación y la eficiencia en la propagación comparadas con la micropropagación convencional en medios semisólidos (Marrero *et al.*, 1998). No obstante es necesario continuar incrementando la eficiencia de este método para lograr su uso efectivo a escala comercial.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se propuso la siguiente hipótesis:

“Es posible incrementar la eficiencia en la propagación de la caña de azúcar (*Saccharum sp. hybrid*) en SIT mediante cambios en la configuración de los sistemas, la eliminación de la fase de elongación, el manejo de la densidad de explantes y el tiempo de cultivo”.

Objetivo general:

Incrementar la eficiencia del proceso de propagación “*in vitro*” de la caña de azúcar en los sistemas de inmersión temporal y realizar su escalado productivo.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la influencia que ejerce la presión de aire después de la inmersión dentro de los frascos, sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas *in vitro*.
2. Estudiar la posibilidad de eliminar la fase de elongación, así como el efecto combinado de la densidad de inóculo, el tiempo de cultivo sobre la producción total de brotes por SIT y la calidad final de las plantas producidas.
3. Realizar el escalado de la propagación en SIT empleando los mejores resultados obtenidos en la investigación.
4. Evaluar el comportamiento en campo de las plantas propagadas en los SIT en comparación con plantas propagadas por el sistema tradicional con 3 genotipos de caña de azúcar de interés comercial para las Repúblicas de Guatemala, Brasil y Cuba.

Revision

Bibliografica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La caña de azúcar. Generalidades

Origen y taxonomía

Es posible que a partir de especies silvestres de *S. spontaneum* y producto de un largo proceso de evolución (Salgado *et al.*, 2003) se originó la caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*, $2n=80$). Ésta es nativa de Nueva Guinea, presentando una prolongada transformación evolutiva, donde jugaron un papel destacado la interacción entre *Ripidium*, *Sclerostachya* y *Miscanthus*, mostrando un alto grado de ploidía, dando como resultado un grupo de especies que forman el género (Dookun., 1998).

Según el sistema de clasificación sugerido por Cronquist (1988), la taxonomía de la caña de azúcar es la siguiente:

<u>Reino:</u>	<u>Plantae</u>
<u>División:</u>	<u>Magnoliophyta</u>
<u>Clase:</u>	<u>Liliopsida</u>
<u>Subclase:</u>	<u>Commelinidae</u>
<u>Orden:</u>	<u>Poales</u>
<u>Familia:</u>	<u>Poaceae</u>
<u>Subfamilia:</u>	<u>Panicoideae</u>
<u>Tribu:</u>	<u>Andropogoneae</u>
<u>Género:</u>	<u><i>Saccharum</i></u>
<u>Especie:</u>	<u><i>S. officinarum</i></u>

Las variedades actuales de la caña de azúcar son híbridos de diferentes especies del género *Saccharum* (Martín *et al.*, 1987), por lo que es más correcto referirse a las cañas cultivadas actualmente como *Saccharum spp. híbrido*.

El cultivo en el mundo, su distribución

La caña de azúcar es uno de los cultivos más importantes en muchos países del mundo, entre los que se encuentran Australia, Brasil, las Islas del Caribe y entre ellas Cuba, fue traída a las Américas en 1498 por los españoles, siendo introducida en Cuba en el año 1543, pero no es hasta principios del siglo XIX, con la introducción de la máquina de

vapor, que Cuba entra en la gran era del azúcar. En el siglo XX cuando Cuba entra en la época mediatizada (20 Mayo 1902), con la introducción de nuevos equipos, los centrales azucareros se fueron modernizando, se construyeron algunos con nuevas tecnologías.

En las primeras décadas del triunfo de la revolución cubana se producía un promedio anual de 5 millones de toneladas de azúcar, siendo el principal producto agrícola e industrial del país, llegándose a dedicar 1.5 millones ha de tierra a este cultivo (el 40 % del área total cultivada). Pero después del año 2002 la situación varió, se redujo la cantidad de tierras dedicadas a este cultivo y concentrándose en los suelos más productivos, existiendo actualmente alrededor de 820 000 ha para su plantación. (Riera, 2004). Por lo que el Ministerio de Azúcar se vio precisado a desarrollar un profundo proceso de transformaciones (Tarea Álvaro Reynoso), encaminada a elevar la eficiencia productiva con reducción de los costos, donde la diversificación de la producción juega un papel fundamental (Rosales, 2003). Se dejaron activos los ingenios más eficientes y los suelos de mayor aptitud para el cultivo, por lo que se reducen 71 centrales, los que pasaron a otras actividades agrícolas, siendo una ventaja inmediata para la economía nacional, con el consiguiente incremento de la eficiencia de la industria azucarera (Cuéllar *et al.*, 2003).

Desde la década del 90 se trabaja en Cuba por lograr una agricultura más ecológica u orgánica, menos dependiente de los costosos insumos de productos químicos y basada en el desarrollo científico – técnico, en aras de alcanzar una verdadera racionalidad ecológica y sustentabilidad económica. La agricultura sostenible se ha convertido en la única solución factible capaz de frenar el deterioro ambiental y garantizar la seguridad alimentaria de las presentes y futuras generaciones (Más, *et al.*, 2007), ello implica que los sistemas de producción deben ser técnicamente factibles, económicamente viables, socialmente justificables y no deben contaminar el ambiente ni dañar los ecosistemas naturales.

2.2 Técnicas de propagación de la caña de azúcar

Generalmente la caña de azúcar se reproduce de forma agámica por estacas (partes de los tallos que contienen de una a tres yemas). Por mucho tiempo esta multiplicación fue la única practicada por el hombre en su reproducción, hasta que se descubrió que también se podía reproducir por medio de sus semillas, ya que éstas son fértiles, lo que permitió en 1880 iniciar en Java y Barbados las primeras multiplicaciones sexuales (Pérez *et al.*, 1997).

Por la necesidad de contar con técnicas que permitieran mejorar la calidad de la semilla y disminuir las áreas destinadas a su producción, se acudió a formas de propagación rápida como: *Seblang*, *Rayungan*, yemas aisladas, *Jieblock* y estacas de una sola yema. La base fundamental de estas técnicas radica en el aprovechamiento de las potencialidades germinativas de cada una de las yemas del tallo (Pérez y Rodríguez, 1987 y Santana, 1997), a pesar de estas ventajas en Cuba no han podido ser utilizadas comercialmente.

Actualmente la propagación por estacas es la que más se emplea en la reproducción o siembra de los campos comerciales, a pesar de ser un método lento. En Cuba este proceso de producción de semilla comercial tarda entre 32 y 36 meses desde que se siembran los bancos de semilla básica hasta que se siembran las plantaciones comerciales (García, 1984, Jiménez, 1995 y Freire, 2001), unido a la imposibilidad de realizar un saneamiento y diagnóstico efectivo a toda la semilla que se utiliza en el proceso (Jiménez, 1995).

Los programas de mejoramiento genético y propagación masiva en esta especie estaban necesitados de un método que permitiera la reducción del tiempo de introducción de las variedades, por lo que surge el cultivo *in vitro*, lo que además permite aplicar las técnicas de conservación del germoplasma, realizar el saneamiento y diagnóstico de la semilla y disminuir las áreas destinadas a su producción (Paulet *et al.*, 1992; Feldmann *et al.*, 1994 y Hernández *et al.*, 1997).

2.3 Cultivo *in vitro* en caña de azúcar

Dentro de las técnicas del cultivo de tejidos la producción de vitroplantas vía organogénesis, constituye la forma más utilizada para estos fines, puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos, empleando medios nutritivos artificiales (Dixon, 1991; Roca y Mroginski, 1993; Jiménez, 1998). Fue en 1965 cuando se creó el primer laboratorio comercial de plantas cultivadas *in vitro* (Debergh y Zimmerman, 1991).

La multiplicación mediante ápices cultivados *in vitro*, ofrece una valiosa alternativa para la reproducción acelerada de semillas agámicas, permitiendo reducir ciclos de multiplicación en los programas de semilla y garantiza la obtención de plantas libres de enfermedades (Pérez *et al.*, 1998).

En la década de los 70 se comienza la propagación masiva en Cuba, construyendo laboratorios con capacidades de alrededor de 200 mil vitroplantas anuales, pero no fue hasta 1987 que se construyó la primera Biofábrica en Cuba, término éste que es manejado hoy en diferentes partes del mundo, posteriormente en el período comprendido entre 1987 a 1993 se construyeron un total de 14 Biofábricas distribuidas por todo el país.

La caña de azúcar constituye la segunda especie vegetal que se reproduce *in vitro* en Cuba, el objetivo fundamental ha sido el rejuvenecimiento y saneamiento de las variedades comerciales, así como garantizar la rápida introducción de nuevas variedades nacionales y foráneas.

Los altos costos en la producción masiva de plantas es uno de los problemas a resolver mediante el cultivo de tejidos (Levin *et al.*, 1988). Las posibilidades de la micropropagación están limitadas como resultado de su bajo coeficiente de multiplicación y el costo de producción relativamente elevado, estas razones hacen necesario el desarrollo de sistemas de producción más eficientes (Lorenzo *et al.*, 1999).

2.4 Embriogénesis somática

Con la introducción, empleo y mejoramiento de la automatización se reducen los costos de producción, se disminuye la manipulación del material vegetal por el hombre, se logra incrementar el ritmo de producción y mejorar la calidad final de las plantas (Bernal *et al.*, 2002).

La embriogénesis somática en caña de azúcar ha surgido como una herramienta del mejoramiento genético y una nueva vía de propagación *in vitro*. Con este método se logra incrementar los coeficientes de multiplicación, ya que se pueden utilizar los principios de la cinética microbiana, disminuye los costos de producción, da la posibilidad de encapsular los embriones, logrando con ello las semillas artificiales y permite automatizar el proceso productivo con el uso de los biorreactores (De Fera, 2000 y Freire, 2001).

Con la utilización de este sistema los brotes siempre están en contacto con el medio de cultivo y por tanto la absorción de los nutrientes y la tasa de crecimiento se ven estimulados, este proceso está controlado mediante un sistema computarizado que controla y monitorea las condiciones microambientales dentro del biorreactor (Jiménez y De Fera, 1998).

Las desventajas de este sistema radican en que es una tecnología muy costosa y no se ha podido lograr su escalado a niveles de producción para la agricultura cañera, otra

desventaja la constituye el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se reporta una embriogénesis somática eficiente que permita un uso productivo del método (Yeung *et al.*, 1996).

Es por lo anterior que ha sido necesario buscar nuevas alternativas en la producción masiva de la caña de azúcar, la Inmersión Temporal es un procedimiento relativamente nuevo de la micropropagación, el que permite incrementos significativos del coeficiente de multiplicación y disminuye la manipulación del material vegetal por el hombre, lográndose un elevado grado de automatización en el proceso (Alvard *et al.*, 1993).

2.5 Automatización de la micropropagación (SIT)

Uno de los problemas a solucionar en estos momentos en la producción masiva es el alto costo de producción por medio del cultivo de tejidos (Levin *et al.*, 1988), fundamentalmente los costos por mano de obra, los que se encuentran entre un 70 – 80 % del costo total del proceso de micropropagación según Wang *et al.* (1999), por otra parte se plantea que estos costos se pueden reducir entre 50 – 80 % según Pérez *et al.* (2000), siendo de vital importancia esta disminución, ya que estos han limitado la utilización de la micropropagación en varias especies vegetales (Ziv, 1995).

El uso de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) ha permitido lograr elevados niveles de proliferación durante la etapa de multiplicación en diferentes especies vegetales (Lorenzo *et al.*, 1998; Aragón *et al.*, 2005; Castro y González- Olmedo, 2005; Molina *et al.*, 2005; Peñate *et al.*, 2007), brindando la posibilidad de controlar las propiedades físico-químicas en el ambiente de los frascos de cultivo en los SIT (Cejas *et al.*, 2005).

Entre los principales parámetros involucrados en la reducción de los costos se incluyen la reducción drástica del trabajo; la reducción del área de estantería; la disminución en el número de frascos a utilizar y mejores rendimientos biológicos (Etienne *et al.*, 2002), además nos permite lograr el escalado de la producción (Priel, 1991; Leathers *et al.*, 1995).

Fue demostrado por Tisserat (1985) que poniendo los explantes en contacto con los medios líquidos de forma intermitente se logra el suministro de nutrientes necesarios a las vitroplantas y se elimina el fenómeno de la hipoxia por no estar estas sumergidas de forma permanente en el medio de cultivo.

Los recipientes de Inmersión Temporal automatizados, comercialmente denominados “RITA[®]” (Figura 1) fueron diseñados a partir del principio desarrollado por Teisson *et al.* (1996) en el Laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier, permitiendo un ahorro importante durante el proceso de micropropagación convencional (Aitken - Christie, 1991; Alvard *et al.*, 1993; Teisson *et al.*, 1994). Los “RITA[®]” constituyen una herramienta estándar para el cultivo de tejidos de plantas, reduce el manejo, simplifica el cambio de medio de cultivo, aumenta el grado de proliferación de brotes y aumenta el peso fresco de los explantes.



Figura 1. “RITA[®]”

Akita y Takayama (1994) realizaron experimentos donde emplearon los SIT, con el que obtuvieron microtubérculos que por su tamaño pueden llevarse al campo directamente. Desde entonces este sistema ha sido ampliamente utilizado y reportado en la literatura por su efectividad en la propagación vía embriogénesis u organogénesis (Teisson *et al.*, 1996, Jiménez y de Feria, 1998).

Los SIT fueron diseñados con el objetivo de reducir o eliminar los efectos negativos del medio de cultivo líquido (hiperhidricidad), basados en el contacto intermitente del medio líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, evitando la acumulación de gases tóxicos, pueden ser utilizados para la producción de brotes vía organogénesis a escala masiva, brindando la posibilidad de automatizar algunas etapas del proceso de micropropagación (Alvard *et al.*, 1993). Además ha sido demostrado que los SIT ofrecen mayor facilidad de escalado, con la finalidad de producir grandes volúmenes de plantas (Jiménez y de Feria, 1998 y Bernal *et al.*, 2002).

Los recipientes de los SIT son más baratos que los biorreactores, de más fácil manejo y uso. Aunque muchos han sido nombrados “biorreactores”, no cumplen con tal definición

por no contar con el total control de los parámetros ambientales (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1994; Escalona, 1999; Jiménez y de Feria, 1998).

No obstante a los incrementos de los coeficientes de multiplicación y la automatización de la fase de multiplicación de la micropropagación con el empleo de los SIT desarrollados por Teisson y Alvard (1995), los que fueron modificados por Lorenzo *et al.* (1998), todavía se emplea gran cantidad de mano de obra en el proceso, lo que obstaculiza la factibilidad económica de cualquier esquema que se desarrolle empleando las técnicas de cultivo de tejido.

En Cuba (Borroto, 1999) reporta los resultados de un sistema automatizado para la propagación masiva de plantas, que ha sido usado con resultados altamente beneficiosos en diferentes especies vegetales como bananos, *Syngonium*, *Dasheen* y *Schefflera* con incrementos significativos del coeficiente de multiplicación de 20 hasta 70 en dependencia del genotipo. También su utilización ha sido exitosa en la obtención de microtubérculos de papa (Jiménez *et al.*, 1998), para la micropropagación de la piña (Escalona *et al.*, 1999) y de la caña de azúcar (de Feria *et al.*, 1998 y Lorenzo *et al.*, 1999, 2000).

En estudios realizados por diferentes autores las plantas derivadas de los SIT siempre han mostrado una mejor eficiencia biológica y productiva, debido al incremento considerable de los coeficientes de multiplicación, por sus altos rendimientos, presentando mayor crecimiento y desarrollo en las condiciones *ex vitro*, comparadas con las provenientes de la micropropagación convencional, manifestándose por consiguiente una considerable reducción de los costos de producción (Teisson y Alvard, 1994; de Feria *et al.*; 1998; Lorenzo *et al.*, 1998; 1999; 2000; Ventura *et al.*, 1998; Escalona *et al.*, 1998 y 1999; Jiménez *et al.*, 1999; Medero *et al.*, 2000 y Pérez, 2001).

En las variedades de papa Desiree y Atlantic, Jiménez *et al.* (1998 y 1999) realizaron estudios utilizando los SIT, demostrando que con su empleo en la micropropagación se amplían las capacidades productivas, con su grado de automatización se disminuyen los riesgos de contaminación y los costos de producción y se logrará mayor cantidad de microtubérculos por plantas que cuando se emplearon medios sólidos. Además en la inducción de tubérculos por plantas, calibre y peso, se logra un mayor índice, comparados con los frascos de cultivo tradicionales (Pérez *et al.*, 1998).

Alvard *et al.* (1993), compararon cinco formas diferentes de suministrarle el medio de cultivo a las vitroplantas con el medio líquido, para ello usaron como material inicial yemas axilares del cultivar "Gran Enano", los medios de cultivos utilizados fueron: líquido (inmersión permanente con o sin burbuja; inmersión parcial; soporte de celulosa; e inmersión temporal) con medio de cultivo semi-sólido, donde este último método produjo los mejores resultados en cuanto al aumento de peso seco y tasa de multiplicación. Por otra parte, Ventura *et al.* (1998), emplearon el SIT en el clon de banano FHIA-18, encontrando mayor coeficiente de multiplicación (15,30) respecto a los medios de propagación convencional (3,70).

Castro, *et al.* (2002) describieron un procedimiento para la multiplicación *in vitro* mediante SIT de plantas de eucalipto procedentes de árboles élités. La mayor eficiencia de multiplicación se estableció a una frecuencia óptima de inmersión cada 12 horas con una duración de 3 minutos. Es por eso que el tiempo de inmersión y su duración o frecuencia son los parámetros más decisivos para la eficiencia del sistema, también la optimización del volumen del medio nutritivo y el volumen del frasco mejoran la eficacia, especialmente para la multiplicación de los brotes (Etienne *et al.*, 2002).

2.6 Sistemas de Inmersión Temporal en la caña de azúcar

Los SIT son una herramienta importante para la micropropagación de la caña de azúcar, lográndose mayores coeficientes de formación de rebrotes que por los sistemas tradicionales de cultivo *in vitro*, además se logra una reducción de los costos de producción. Lorenzo *et al.* (1998) en estudios realizados lograron duplicar la tasa de multiplicación y la altura de los brotes en los SIT en comparación con la micropropagación convencional; permitiendo reducir los costos hasta en un 46 %.

Son varios los factores que se deben de tener presente al utilizar los SIT como método de reproducción *in vitro* en la caña de azúcar, la densidad de inóculo, la producción de brotes y la calidad final de las plantas han sido algunos de estos factores estudiados por de Feria *et al.*, 1998, determinando que al emplear 40 brotes por frasco como inóculo inicial se logra la mayor cantidad de brotes por unidad de SIT (437) y una producción de biomasa de 251 g, la frecuencia y tiempo de duración de las inmersiones de la caña de azúcar en los SIT ha sido otro de los factores estudiados. Jiménez (1995), utilizó frascos de cultivo de 4000 ml de capacidad total con 3000 ml de medio de cultivo de

multiplicación, realizando cuatro inmersiones por día con 12 minutos de duración cada una, cuando se realizó la renovación del medio de cultivo la producción total de brotes por unidad de SIT fue superior, lográndose hasta 520 brotes y un coeficiente de multiplicación de 13, cambiando el medio de cultivo a los 15 días.

En la propagación masiva de la caña de azúcar Pérez *et al.* (1998), logró mayor número de brotes por unidad de SIT (437 vitroplantas) y una producción de biomasa de 251 g. Por otra parte con la variedad C1051-73 Lorenzo *et al.* (1998), duplicaron la tasa de multiplicación y la altura de los brotes en los SIT en comparación con la micropropagación convencional.

También Escalona *et al.* (1998), demostraron que a medida que se aumentó la disponibilidad de medio de cultivo en la micropropagación de la caña de azúcar en los SIT se logró un coeficiente de multiplicación mayor, decreciendo éste cuando las cantidades de medio de cultivo eran excesivamente grandes en relación con la cantidad de material vegetal que se inoculaba en los sistemas.

Bernal *et al.* (2002), demostraron que independientemente del genotipo de caña de azúcar los resultados que se obtienen en el los SIT demuestran las ventajas que estos aportan para su multiplicación por esta vía y que pueden ser incluidos estos sistemas en una estrategia a escala productiva a partir de la definición de los tiempos empleados para desarrollar cada etapa del proceso.

Por otra parte Posada *et al.*, 2003, estudiaron la mejor combinación para lograr altos coeficientes de multiplicación en la caña de azúcar empleando los RITA, obteniendo los mejores resultados cuando se utilizó el medio de cultivo de multiplicación propuesto por Jiménez (1995), dos explantes como inóculo y una frecuencia de inmersión de tres veces al día durante un minuto, demostrando además que el medio de cultivo líquido en los RITA puede permanecer hasta 30 días sin ser cambiado, sin que esto afecte la multiplicación de los explantes de caña de azúcar, lo cual puede disminuir los riesgos de contaminación.

También Mordocco *et al.*, 2008 en Australia, estudiaron el tiempo de cultivo, así como el tiempo y frecuencia de inmersión con la variedad Q 165, obteniendo como resultados que los explantes cultivados por 45 días en el medio de de inducción de brotes SmartSett®

fueron los más prolíferos, produciendo un promedio de 275 brotes por frasco después de 45 días de cultivo en RITA® con un minuto de inmersión cada 12 o 24 horas.

Estos resultados demuestran que aparte del ritmo y el tiempo de inmersión de los explantes, lo que ha sido abordado con anterioridad (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1994) en los SIT en medio líquido, es necesario tener en cuenta otros factores que influyen sobre la producción total de brotes y la calidad de los mismos, tales como son la densidad de inóculo, la frecuencia y tiempo de inmersión, así como la renovación del medio de cultivo.

La simplicidad y el bajo costo de los SIT desarrollados son compatibles con la propagación a gran escala, sin embargo es probable que se puedan realizar nuevas simplificaciones en vistas de reducir aún más los costos, ya que pueden ser optimizados para diferentes especies vegetales, entre ellas la caña de azúcar, puesto que en este cultivar se han utilizado ampliamente con vistas a su aplicación comercial (Etienne *et al.*, 2002).

2.7 Utilización de reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro*

Las técnicas de cultivo de tejidos se desarrollaron gracias a la acción de los reguladores del crecimiento, los que tienen la capacidad de producir alargamiento celular, así como promueven la división celular (Jankiewics, 2000; Slater *et al.*, 2004).

Los retardantes del crecimiento, inhibidores de la síntesis de giberelina han sido ampliamente utilizados en la agricultura para el control del crecimiento (Aron *et al.*, 1985; Beausher y Yelenosky, 1987; Early y Martín, 1988). También han sido utilizados para la disminución de la longitud y número de las raíces laterales y la germinación de las semillas (Early y Martín, 1988; Beausher y Yelenosky, 1987).

El papel de los retardantes del crecimiento también se han reportado para la propagación *in vitro* y su influencia en el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas (Werbrouck y Debergh, 1996; Ziv *et al.*, 1998).

El PBZ se encuentra entre los compuestos triazólicos, inhibidores de la síntesis de las giberelinas (Grossman *et al.*, 1991), su efecto incluye la biosíntesis del ácido abscísico y las citoquininas. Werbrouck y Debergh (1996) reportaron su interacción sinérgica entre algunos fungicidas imidazólicos relacionados estructuralmente con el PBZ y la aplicación

exógena de las citoquininas, mientras que Ziv (1995) reportó la reducción de los brotes del área foliar con la utilización del PBZ.

El PBZ fue reportado en fase de multiplicación en SIT por Daquinta *et al.*, 1999, estableciendo la dosis para su uso (0,12 mg/l) para estimular la formación de clusters (brotes compactos) en algunas bromelias, lográndose un elevado número de plantas uniformes y aptas para la adaptación a condiciones *ex vitro*, siendo también reportado por (Ziv y Hadar, 1991).

Escalona (1999) en el cultivo de la piña, desarrolló un sistema automatizado más eficiente que la micropropagación convencional, basado en el uso de PBZ en SIT, el cual reduce los costos de producción en un 66,7 %, reportándose un incremento en crecimiento y desarrollo en condiciones *ex vitro* comparadas con las plantas obtenidas por la micropropagación convencional, no existiendo diferencias fenotípicas o genotípicas con las plantas provenientes de la propagación vegetativa tradicional.

El uso de los SIT en el cultivar cv. Gran enano en la fase de multiplicación fue reportado por Albany (2001), a los medios de cultivo se les incorpora 2,5 mg/l de PBZ, con lo que disminuye el crecimiento innecesario de los tallos y hojas de los brotes, obteniéndose un mayor número de brotes por explante inoculado. Con la inoculación de 25 explantes en los SIT y la renovación con 1000 ml de medios de cultivos en 15 días, permitió obtener los mejores valores de productividad reflejados en el número de brotes por explantes, permitiendo estos resultados la incorporación de la técnica de Inmersión Temporal como uno de los manejos convencionales para la micropropagación en este cultivo.

2.8 Retardantes del crecimiento en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar

La utilización del PBZ en los medios de cultivos constituye un fuerte inhibidor de la síntesis de giberelinas y estimulante del metabolismo de las citoquininas en caña de azúcar, Ziv, 1995 y Lorenzo *et al.*, 1999 realizaron estudios en SIT, en los que se observó una disminución en la longitud de los brotes, lo que se relaciona con la supresión de la síntesis de giberelinas, así como una disminución del área foliar y un aumento de los coeficientes de multiplicación, el cual puede estar relacionado con la disminución del área foliar, existiendo más disponibilidad de nutrientes para el incremento de los primordios meristemáticos, pero de forma contraria se demostró que el aumento de las

concentraciones de PBZ en los medios de cultivos de multiplicación provocan una disminución en los coeficientes de propagación (Marrero *et al.*, 1998).

Marrero *et al.*, 1998, establecieron un protocolo para la micropropagación de caña de azúcar en la variedad C1051-73 a través de los SIT a escala productiva, logrando la formación de nuevos brotes con 50 ml/explante de medio de cultivo y 1.0 mg/l de PBZ por 30 días, seguido de la elongación de los brotes formados, empleando 1.0 mg/l de ácido giberélico por 15 días. Luego fueron enraizadas y aclimatadas y comparadas con las plantas obtenidas por el sistema tradicional de micropropagación en condiciones de campo por más de nueve meses, cuyo comportamiento fue similar en cuanto a altura, diámetro y número de tallos por planta.

2.9 Influencia del ambiente *in vitro* en el proceso morfogénico de la propagación en los sistemas de inmersión temporal

La influencia del ambiente *in vitro* en el proceso morfogénico de la micropropagación ha sido poco estudiado, específicamente el efecto que tienen determinados gases que se acumulan en la fase gaseosa de los frascos de cultivo en los SIT, como son el oxígeno, el dióxido de carbono y el etileno, siendo el efecto del oxígeno el más estudiado en la embriogénesis de diferentes cultivos como *Picea abies* (Kvaalen y Arnold, 1991), *Daucus carota* (Jay *et al.*, 1992; Shigeta *et al.*, 1996; Shimazu y Kurata, 1999), *Cyclamen persicum* (Hohe *et al.*, 1999), *Oryza sativa* L. (Okamoto *et al.*, 1996), café (Jiménez *et al.*, 1995; de Fera, 2000).

Sin embargo aún es insuficiente la atención que se le ha prestado a la influencia de otros componentes del ambiente físico *in vitro*, sobre todo en el proceso de inmersión temporal, como son el dióxido de carbono y el etileno, es conocido que el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* puede ser afectado por la composición de la atmósfera gaseosa (Jackson *et al.*, 1987; Blazková *et al.*, 1989; Kozai *et al.*, 1986, 1989 y 1991), por su parte Barbón (2003), realizó estudios sobre un grupo de aspectos que están relacionados con la influencia del ambiente *in vitro* en el proceso morfogénico de la embriogénesis somática, específicamente el efecto que tienen determinados gases que se acumulan en la fase gaseosa de los frascos de cultivo, como son el oxígeno, el dióxido de carbono y el etileno sobre la embriogénesis somática).

Kubota y Kozai, 1992, observaron que las principales características del ambiente *in vitro* son la elevada humedad relativa, las fluctuaciones diurnas en la concentración de CO₂ y la acumulación de etileno y otras sustancias tóxicas, dando como consecuencia que la transpiración, la fotosíntesis, la toma de agua, de nutrientes y CO₂ pueden ser reprimidas y estimular la respiración, lo que ocasiona un pobre crecimiento de las plantas (Jeong et al., 1995), pudiendo aparecer desórdenes fisiológicos y morfológicos en las plantas *in vitro* (Debergh y Maene, 1984); los cuales incluyen cambios morfogénéticos no deseados que son muy variados y dependen de la especie vegetal (Jackson et al., 1987).

Es conocido que las plantas cultivadas *in vitro* liberan sustancias que pueden acumularse y tener efectos nocivos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Heyser y Mott, 1980), siendo el etileno el producto gaseoso más ampliamente estudiado.

El etileno es un compuesto volátil con efectos como regulador del crecimiento de las plantas. Este tiende a acumularse en los vasos de cultivo, en especial cuando el intercambio de aire es limitado y esta acumulación es asociada con varias respuestas fisiológicas de las plantas cultivadas *in vitro*, tales como: pobre diferenciación celular (Miller y Roberts, 1984), ausencia de embriogénesis somática (Meijer y Brown, 1988; Purnhauser et al., 1987; Roustan et al., 1989), disminución de la altura de los brotes y del área de las hojas (Jackson et al., 1987 y 1991), hiperhidricidad o desarrollo anormal en un número de especies (Jackson et al., 1991), senescencia de las hojas y disminución del crecimiento (Jackson et al., 1991), poca proliferación y crecimiento de los callos (Adkins et al., 1990 and 1993), fotosíntesis reducida (Zobayed et al., 1999) o inducción de epinastia (Zobayed et al., 2001).

Ha sido reportado por Zobayed (2005), que al emplear vasos ventilados (ventilación pasiva o forzada), la falta de CO₂ durante el foto período puede ser reducida considerablemente y mantenerse cercanas a las concentraciones atmosféricas, en dependencia del tamaño de las plantas cultivadas *in vitro*, de igual forma reportó que el contenido de clorofila puede incrementarse significativamente mediante el empleo de ventilación forzada (Zobayed (2005) y esto conjuntamente con la mayor disponibilidad de CO₂ incrementar las tasas de fotosíntesis y el incremento del rendimiento en biomasa y multiplicación de los brotes.

2.10 Influencia de la propagación *in vitro* en el rendimiento agrícola

Como resultado del rejuvenecimiento o cambios temporales las plantas propagadas *in vitro* muestran variaciones que influyen en el rendimiento agrícola, tales como: incremento en el número de tallos o ramas, aumento en la susceptibilidad a enfermedades, retardo de la floración (Evans *et al.*, 1986 y Jiménez, 1995).

La caracterización morfológica y agronómica se ha utilizado en el estudio de la estabilidad genética entre plantas procedentes del cultivo de tejidos *in vitro*, especialmente en plantas regeneradas vía organogénesis (Smith y Hamill, 1993; Sandoval *et al.*, 1997), ya que es el método de propagación *in vitro* más utilizado. Por otra parte, son pocos los estudios que se han realizado sobre la estabilidad genética en plantas obtenidas vía embriogénesis y por los SIT.

En caña de azúcar, como resultado del rejuvenecimiento o cambios temporales, las plantas propagadas *in vitro* han manifestado variaciones como son el incremento en el retardo de la floración, el aumento del vigor, el incremento del número de tallos, aumento de la susceptibilidad a una enfermedad, entre otras, las que influyen en el rendimiento en el campo (Evans, 1986; Peros y Bonnel, 1990; Jiménez 1995 y Pérez, 1998), lo cual puede estar asociado a cambios fisiológicos temporales inducidos por el proceso de cultivo *in vitro*.

Las enfermedades sistémicas y su incidencia en plantas propagadas *in vitro* sembradas en condiciones de campo han sido estudiadas por diferentes autores, los que han reportado una menor ocurrencia de las enfermedades sistémicas (raquitismo, escaldadura, VMCA) sobre la semilla procedente de plantas cultivadas *in vitro* que en las sembradas por las formas tradicionales (Anderlini y Kotska, 1986; Jackson *et al.*, 1990; Flynn y Anderlini, 1990), por otra parte se ha reportado una mayor afectación por la roya en plantas micropropagadas, pudiendo estar esto relacionado con los cambios fisiológicos temporales inducidos por el propio cultivo *in vitro* (Peros y Bonnel, 1990).

En Cuba el Programa Nacional de Semilla ha demostrado que la propagación *in vitro* constituye un sistema muy efectivo para contrarrestar las enfermedades sistémicas que inciden en el cultivo de la caña de azúcar, obteniéndose mejores rendimientos agrícolas ocasionados por el efecto del rejuvenecimiento y saneamiento de la semilla (Pérez *et al.*, 1996; Freire, 2001).

Lorenzo *et al.* 1998, comprobaron que los indicadores de desempeño agrícola entre las plantas procedentes de los SIT y las plantas propagadas convencionalmente en campos de caña de azúcar por más de 9 meses se manifiestan en ellas de forma similar.

Estudios realizados con plantas procedentes de los SIT por Lorenzo, 2001, han demostrado que estos son una herramienta importante para la micropropagación de la caña de azúcar, en sus investigaciones demostró el valor agrícola de las plantas de caña de azúcar obtenidas en los SIT al estudiar su comportamiento en el campo. Por otra parte también evaluó dos tratamientos testigos que representaban las formas convencionales de micro y macro propagación. Registró el crecimiento de los plantones de caña de azúcar en el primer retoño y la utilización de las plantas micropropagadas para la macro propagación. Evaluó algunas características botánicas y químicas de las plantas, encontrando diferencias solo entre los dos sistemas de propagación en los primeros 6 meses de ser cultivadas en el campo, esto en cuanto a la longitud y diámetro del tallo. Tales diferencias desaparecieron en el transcurso del experimento.

No obstante todos los estudios realizados, comparando la semilla propagada *in vitro* con la semilla convencional (esquejes de tres yemas) o semilla tratada con calor, han demostrado que la propagación *in vitro* es un sistema convincente para combatir las enfermedades sistémicas que afectan la caña de azúcar, presentando ventajas adicionales respecto al rendimiento agrícola, debido al efecto combinado del saneamiento y el rejuvenecimiento.

Materialiales

y

Metodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en la Biofábrica de Caña de Azúcar perteneciente al Ingenio Santa Ana en la República de Guatemala, en los años 2006, 2007 y 2008.

En la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Cuba) y en la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez”, perteneciente al Centro de Tecnología Estratégicas del Nordeste, Pernambuco, Brasil, se desarrolló el escalado de los resultados que se derivaron de los experimentos de esta tesis.

3.0. Procedimientos generales

Material vegetal

Como material vegetal inicial se utilizaron ápices meristemáticos de tres variedades de caña de azúcar (CP72 2086, Mex79 431 y la RB73 2577), los que se encontraban en condiciones de campo en el banco de donantes del Ingenio Santa Ana de la República de Guatemala. Los donantes de los utilizados en la Biofábricas de Brasil (RB73 2577) y Cuba (Mex79 431) procedían de sus respectivos bancos de donantes.

Los procedimientos para el establecimiento y el cultivo *in vitro* se desarrollaron según la metodología propuesta por Jiménez *et al.* (1995), para la micropropagación de la caña de azúcar. Los explantes fueron cultivados en frascos de 250 ml, añadiéndoseles 25 ml de medios de cultivos. Para el montaje de los experimentos en los SIT se utilizaron clústeres de 2 a 3 brotes con más de 1.0 cm de altura, en segundo subcultivo de multiplicación.

Instrumental de laboratorio

Con el fin de lograr la manipulación aséptica del material vegetal utilizado en los experimentos, todo el instrumental fue esterilizado en estufa con flujo de aire forzado, a una temperatura de 180 °C durante dos horas.

Posteriormente para la desinfección en la cabina de flujo laminar durante las operaciones de transferencias, el instrumental se colocó en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % según la metodología propuesta por Agramonte *et al.* (1993). Todas las operaciones de disección y transferencia se realizaron en cabinas de flujo laminar horizontal.

Medios de cultivo

El medio de cultivo para el establecimiento fue el medio de cultivo basal compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962), sales MS suplementado con las vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969), 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 0,2 mg.L⁻¹ de 6-Benzylaminopurina (6 BAP), 2 % de sacarosa, se ajustó el pH a 5,8 con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N) previo a la esterilización (Jiménez, 1995). Como agente gelificante se utilizó Agar (SIGMA Chemical Co), a razón de 5.0 g.L⁻¹.

El medio de cultivo para la multiplicación en la micropropagación convencional fue el medio de cultivo basal compuesto por las sales MS, las vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969), 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 0,3 mg.L⁻¹ de 6 BAP, 3,0 % de sacarosa en estado líquido o semisólido. En el estado semisólido se utilizó como agente gelificante Agar-Agar (SIGMA Chemical Co), a razón de 5.0 g.l⁻¹ y se ajustó el pH a 5,8 con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N) previo a la esterilización (Jiménez, 1995).

Para la multiplicación en los Sistemas de Inmersión Temporal el medio de cultivo utilizado estuvo compuesto por las sales MS, enriquecidas con 0,6 mg.L⁻¹ de 6-BAP, 1,0 mg.L⁻¹ de Paclobutrazol (PBZ), 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 3,0 % de sacarosa y se reguló el pH previo a la esterilización a 5,8 (Lorenzo *et al.*, 1998).

En la elongación de los explantes en los SIT el medio de cultivo empleado estaba compuesto por las sales MS, enriquecidas con 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 1 mg.L⁻¹ de ácido giberélico, 1,0 mg.L⁻¹ vitamina y 3,0 % de sacarosa y se reguló el pH a 5,8 previo a la esterilización (Lorenzo *et al.*, 1998).

El enraizamiento de los explantes en los SIT se realizó utilizando el medio de cultivo compuesto por las sales MS, suplementada con 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 1.3 mg.L⁻¹ de AIA (Acido Indolacético), 4.0 % de sacarosa y se reguló el pH previo a la esterilización a 5,8 (Jiménez, 1995).

La esterilización de los medios de cultivos de los SIT se efectuó en una autoclave horizontal a 121 °C y 1,2 Kg.f.cm.⁻² de presión durante 20 minutos.

Componentes de los Sistema de Inmersión Temporal

El Sistema de Inmersión Temporal (SIT) estuvo conformado por dos frascos de polipropileno (NALGENE) de 10 litros, los que contenían 4 litros de medio de cultivo, uno de los frascos es utilizado como vaso de cultivo para el crecimiento de los explantes y otro como depósito del medio de cultivo (Lorenzo *et al.*, 1998; de Feria *et al.*, 2002).

Los frascos fueron conectados entre sí por una manguera de silicona (6 mm de diámetro interior) mediante los conectores de plástico que tienen las tapas. En la parte interna de la tapa se colocó una manguera de 6 mm de silicona al conector interno, el mismo en que se encuentra la manguera que une los frascos por su parte exterior. La manguera interna desciende hasta el fondo de los botellones, de modo que permitió el intercambio del medio de cultivo, la que debe tener menos flexibilidad que las exteriores para evitar su suspensión junto con los explantes y el medio de cultivo al momento de la inmersión.

El medio de cultivo circuló de un frasco a otro mediante la presión de aire que es regulada por un manómetro acoplado a un compresor y controlada por la apertura o cierre de las electroválvulas (Solenoides de ½") de dos vías, las que al abrirse y cerrarse indistintamente permitieron la circulación del aire y por consiguiente del medio de cultivo de un recipiente a otro. Estas fueron conectadas a un temporizador programable, con el que se reguló la frecuencia y la duración de la inmersión (Lorenzo *et al.*, 1998), en la figura 2 se ilustra como un todo el diagrama para la conexión de este sistema.

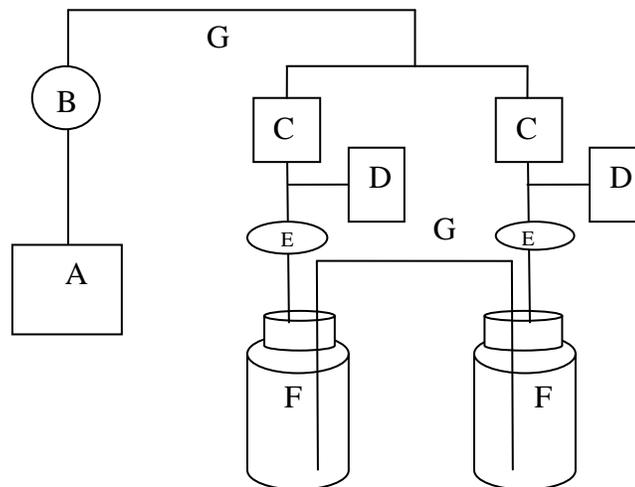


Figura 2. Conexión de los componentes del sistema de inmersión temporal, A: Compresor, B: Manómetro, C: Válvulas de entrada de aire, D: Válvulas de salida del aire, E: Filtros Milipore, F: Frascos, G: Mangueras de Silicona

En la conexión de las tuberías conductoras del aire con los frascos se colocaron filtros hidrofóbicos (0.22 μm (Milipore y Sartorius AG), para el filtraje del aire (Figura 3).



C Figura 3: Conexión de las mangueras y filtros en los SIT

Condiciones de incubación

Los explantes se colocaron en cámaras de crecimiento con luz natural con una intensidad luminosa de 100-125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y una temperatura promedio de 28 ± 1 °C según lo descrito por De Fera *et al.* (2002). El fotoperíodo fue de 16 h luz y 8 h de oscuridad. El SIT se ajustó a una frecuencia de inmersión de 5 minutos cada 3 horas. La fase de proliferación se desarrolló durante 4 semanas, la de elongación por 2 semanas y la fase de enraizamiento durante 3 semanas.

Aclimatización

Las plantas de todos los experimentos enraizadas *in vitro* fueron llevadas a la fase de aclimatización, con el fin de evaluar la eficiencia de los medios empleados en la fase de enraizamiento con relación a su sobrevivencia en la aclimatización. A las 3 semanas de cultivo en medio de enraizamiento las plantas fueron trasplantadas a bandejas de polietileno que poseían 52 cm de largo, 29 cm de ancho y 4 cm de alto, con 72 alveolos, las cuales fueron previamente llenadas con sustrato formulado con compost, tierra negra

(Cambisol Eutricto según la clasificación de suelos de Spaargaren *et al.*, 1994) y vermiculita en una proporción (60-30-10).

El compost procedía del ingenio Santa Ana (Guatemala), sustrato al cual se le determinó su caracterización química en los laboratorios del ingenio (pH 7.4, MO 29.24 %, N 1.20 %, K 0.57 %, Ca 2.95 %, CE 1.03, Mg 3.26 %, C/N 13.4). La tierra negra fue tomada de los terrenos de la Biofábrica y esterilizada a 180 °C en un esterilizador con resistencias eléctricas construido para esos fines, mientras que la vermiculita provenía de la planta de los Volcanes, con una granulometría en el rango < 4 mm, con una alta capacidad de intercambio catiónico (CIC) superior a 200 meq/100g.

Las plantas crecieron en condiciones de luminosidad reducida al 60 %, mediante una malla plástica Saran, a una temperatura promedio de 28±2 °C y con una humedad relativa del 80 %. El riego se realizó mediante la técnica de riego localizado con microaspersores aéreos, con una frecuencia de 3 riegos diarios en las dos primeras semanas y dos en las restantes, con una duración de 2 a 5 minutos cada uno. La fase de aclimatización se desarrolló durante 6 semanas según Rodríguez *et al.* (2003).

3.1 Influencia de la presión de aire en los SIT sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas *in vitro*

Con el objetivo de estudiar la influencia que ejerce la presión de aire que queda en los frascos después de la inmersión sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas *in vitro*, se compararon dos configuraciones de SIT.

La primera variante es la utilizada por Lorenzo *et al.*, (1998, 2000), la cual mantiene la presión de aire después de la inmersión dentro de los frascos (Figura 4 (I)). Para la segunda variante se añadió una tercera válvula Solenoide de ¾" con el objetivo de liberar la presión de aire en los frascos como se muestra en la Figura 4 (II). Las variantes contaron con 9 réplicas por SIT cada una.

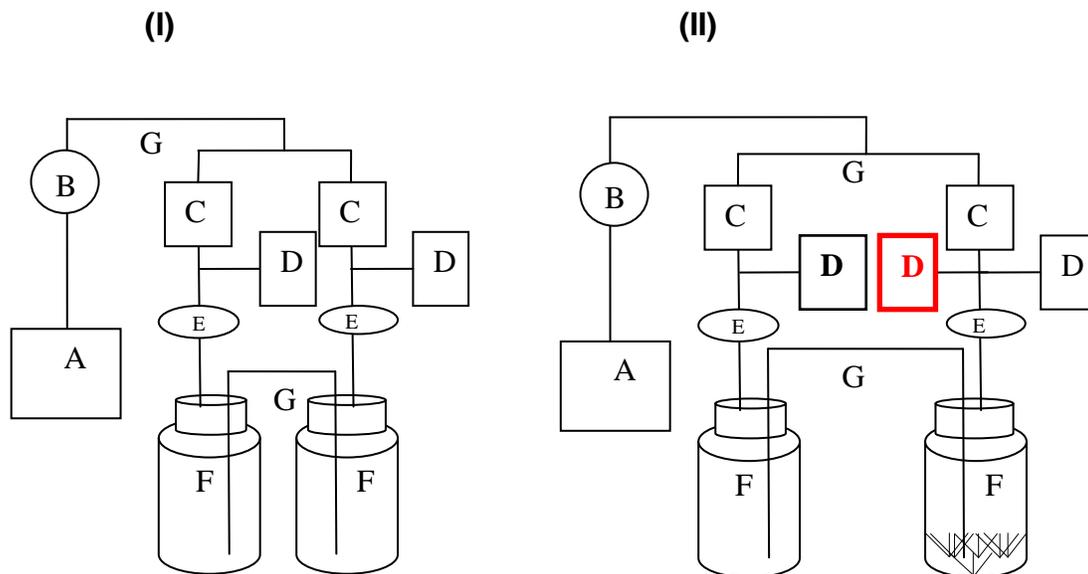


Figura 4. Diagrama de las dos configuraciones de SIT empleadas, sistemas de inmersión temporal con presión, A: Compresor, B: Manómetro, C: Válvulas de entrada de aire, D: Válvulas de salida del aire, E: Filtros Milipore, F: Frascos, G: Mangueras de Silicona, sistemas de inmersión temporal sin presión, A: Compresor, B: Manómetro, C: Válvulas de entrada de aire, D: Válvulas de salida del aire, E: Filtros Milipore, F: Frascos, G: Mangueras de Silicona

Los explantes que se utilizaron para iniciar los experimentos eran brotes con más de 1.0 cm de altura de la variedad CP72 2086 procedente del banco de donantes de la Biofábrica, los que se encontraban en un segundo subcultivo de multiplicación y se inocularon 40 brotes por SIT.

La formulación de los medios de cultivo para las fases de multiplicación y elongación en los SIT fue la recomendada por Lorenzo *et al.*, (1998) y para el enraizamiento se utilizó el medio de cultivo propuesto por Jiménez (1995), los que fueron explicados en los procedimientos generales.

Las variables que se evaluaron en las distintas fases fueron:

Fase de multiplicación: Número total de plantas por SIT y cálculo de los coeficientes de multiplicación.

Fase de enraizamiento: Porcentaje de plantas con raíz, número hojas, porcentaje de plantas deformadas, longitud de los tallos (cm) desde la base hasta la hoja +1, grosor de los tallos (cm), la longitud de las hojas (cm) y ancho de las hojas (cm).

Fase de aclimatización: Conteo de la sobrevivencia de las plantas con raíz y de las plantas sin raíz a los 15 y 30 días de sembradas.

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó la prueba no paramétrica de Mann Whitney para $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico de SPSS/PC versión 18 para Windows.

3.2 Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT

El objetivo de este experimento fue estudiar la posibilidad de eliminar la fase de elongación de la caña de azúcar en los SIT. Para ello se evaluaron dos tratamientos, el primero fue el protocolo descrito por Lorenzo *et al.*, (1998), que consta de una fase de multiplicación con MS + 0.6 mg.L^{-1} de 6-BAP y 1.0 mg.L^{-1} de PBZ, una fase de elongación con MS + con $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ AG_3 y finalmente la fase de enraizamiento con MS + 1.3 mg.L^{-1} de AIA (Jiménez, 1995), fueron montadas 9 réplicas en cada tratamiento. El diagrama del tratamiento se muestra en la figura 5 (A).

En el segundo tratamiento se empleó el medio de cultivo de multiplicación con MS + 0.6 mg.L^{-1} de 6-BAP, 0 mg.L^{-1} de PBZ, con transferencia directa a la fase de enraizamiento, utilizando el medio de cultivo propuesto por Jiménez, (1995) y fueron montadas 9 réplicas en cada tratamiento. En la figura 5 (B) se muestra el esquema utilizado para el experimento con los SIT.

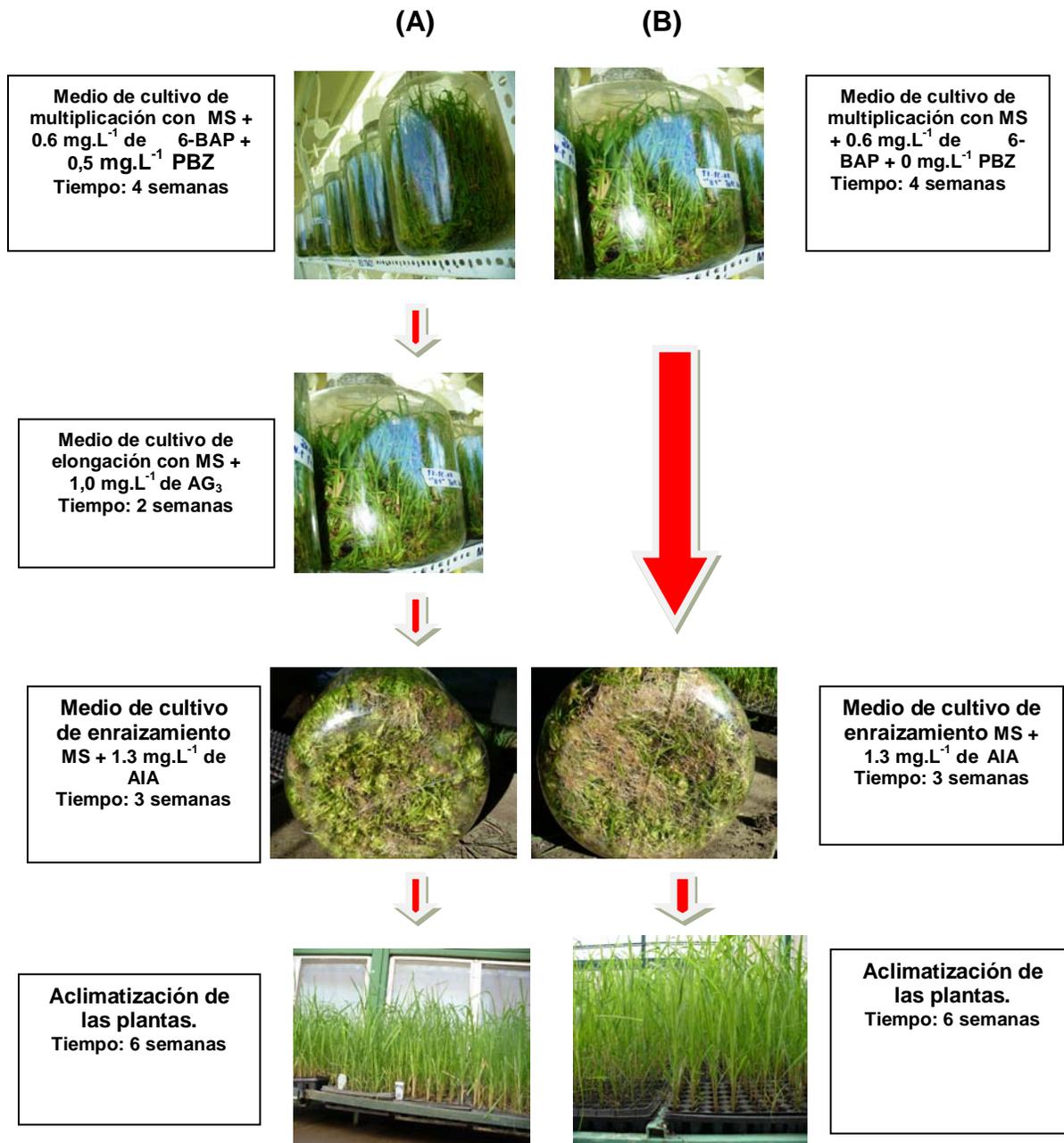


Figura 5. Comparación de dos procedimientos de propagación en los sistemas de inmersión temporal, A: SIT con 0,5 mg.L⁻¹ de PBZ en el medio de multiplicación y fase de elongación, B: SIT sin PBZ en el medio de multiplicación y transferencia directa a enraizamiento

Para el montaje de los experimentos los explantes que se utilizaron fueron brotes con más de 1.0 cm de altura de la variedad CP72 2086, procedente del banco de donantes de la Biofábrica del Ingenio Santa Ana, los que se encontraban en un segundo subcultivo de multiplicación (de Feria, 2002).

Las variables evaluadas en las distintas fases fueron:

Fase de multiplicación: Número total de plantas por SIT y cálculo de los coeficientes de multiplicación.

Fase de enraizamiento: Porcentaje de plantas con raíz, porcentaje de plantas deformadas, longitud de los tallos (cm) desde la base hasta la hoja +1, grosor de los tallos (cm), ancho de las hojas, la longitud de las hojas (cm), número de hojas .

Fase de aclimatización: Cuento de la sobrevivencia de las plantas con raíz y de las plantas sin raíz a los 15 y 30 días de sembradas.

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó la prueba no paramétrica de Mann Whitney para $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico de SPSS/PC versión 18 para Windows.

3.3 Efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo

Como objetivo de este experimento se planteó estudiar el efecto vinculado de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo (fases de multiplicación y enraizamiento) sobre la producción total de brotes por SIT y la calidad final de las plantas producidas.

Para esto se evaluaron dos tratamientos, en el primero se inocularon 40 explantes por SIT y el tiempo de cultivo fue de 7 semanas, 4 semanas de multiplicación y 3 semanas de enraizamiento. Para el segundo tratamiento se inocularon 35 explantes y el tiempo de cultivo fue de 6 semanas, 4 semanas de multiplicación y 2 semanas de enraizamiento, ambos tratamientos contaron con 9 réplicas.

Para el montaje de los dos tratamientos se utilizó la variante (B) del experimento 3.2, empleándose el medio de cultivo de multiplicación con MS + 0.6 mg. L⁻¹ de 6-BAP, 0 mg.L⁻¹ de PBZ, con transferencia directa a la fase de enraizamiento, utilizando el medio de cultivo propuesto por Jiménez, (1995). Se montaron 9 réplicas en cada tratamiento, tomándose como patrón los estudios realizados por Jiménez *et al.*, (1995), de Feria *et al.*, (1998 y 2002) y Albany (2001).

Los explantes que se utilizaron fueron brotes con más de 1.0 cm de altura de la variedad CP72 2086, provenientes del banco de donantes del Ingenio Santa Ana, los que se encontraban en un segundo subcultivo de multiplicación (de Feria, 2002).

Al terminar estas fases las plantas cultivadas en los SIT fueron sembradas en la fase de aclimatización de la Biofábrica.

Como parámetros a evaluar en las diferentes fases se midieron:

Fase de multiplicación: Número total de plantas por SIT y cálculo de los coeficientes de multiplicación.

Fase de enraizamiento: Porcentaje de plantas con raíz, porcentaje de plantas deformadas, longitud de los tallos (cm) desde la base hasta la hoja +1, grosor de los tallos (cm), número de hojas, ancho de las hojas (cm), la longitud de las hojas (cm).

Fase de aclimatización: Conteo de la sobrevivencia de las plantas con raíz y de las plantas sin raíz a los 15 y 30 días de sembradas.

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico de SPSS/PC versión 18 para Windows.

3.4 Escalado de la propagación en los SIT en 3 genotipos de caña de azúcar

El objetivo de este ensayo fue evaluar la eficiencia de las mejoras introducidas en la propagación en los SIT obtenidas en los experimentos anteriores, en 3 genotipos comerciales de caña de azúcar de interés para las Repúblicas de Guatemala, Brasil y Cuba. Las variedades utilizadas fueron la CP72 2086 (control utilizado en los anteriores experimentos), siendo ésta la principal variedad de la industria azucarera en Guatemala con un 60 % en su composición varietal, la RB73 2577 de interés para algunas regiones cañeras del Brasil y la Mex79 431 con las que se han realizado algunas pruebas en Cuba y ocupa el 15 % en la composición varietal del ingenio Santa Ana de Guatemala.

Para el montaje del ensayo se utilizó el medio de cultivo de multiplicación con MS + 0.6 mg.L⁻¹ de 6-BAP, 0 mg.L⁻¹ de PBZ, con transferencia directa a la fase de enraizamiento

utilizando el medio de cultivo propuesto por Jiménez, (1995). Se montaron 9 réplicas en cada tratamiento, tomándose como patrón los estudios realizados por Jiménez *et al.*, (1995), de Feria *et al.*, (1998 y 2002) y Albany (2001).

Los explantes que se utilizaron fueron brotes con más de 1.0 cm de altura, provenientes del banco de donantes de la Biofábrica del Ingenio Santa Ana, los que se encontraban en un segundo subcultivo de multiplicación (de Feria., 2002).

En los años 2007 y 2008 se realizó el escalado en la Biofábrica del Ingenio Santa Ana de Guatemala, con un total de 48 SIT por variedad (CP72 2086, Mex79 431 y la RB73 2577), en la Biofábrica de Brasil el escalado se realizó con la variedad RB73 2577 y en Cuba con la variedad Mex79 431.

Las plantas cultivadas y enraizadas en los SIT fueron sembradas en la fase de aclimatización de la Biofábrica.

Como parámetros a evaluar en las diferentes fases se midieron:

Fase de multiplicación: Número total de plantas por SIT y cálculo de los coeficientes de multiplicación.

Fase de enraizamiento: Porcentaje de plantas con raíz, longitud de los tallos (desde la base hasta la hoja +1), grosor de los tallos.

Fase de aclimatización: Conteo de la sobrevivencia de las plantas con raíz y de las plantas sin raíz a los 15 y 30 días de sembradas.

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los resultados del experimento realizado se empleó la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico de SPSS/PC versión 18 para Windows.

3.5 Estudio en campo de plantas propagadas en los SIT en 3 genotipos de caña de azúcar

El objetivo del experimento fue estudiar el comportamiento en campo de las plantas propagadas en los SIT en comparación con plantas propagadas por el sistema tradicional.

Se utilizaron 3 genotipos de caña de azúcar de interés comercial para las Repúblicas de Guatemala, Brasil y Cuba. Las variedades utilizadas fueron la CP72 2086 (control utilizado en los anteriores experimentos) siendo esta la principal variedad de la industria azucarera en Guatemala con un 60 % en su composición varietal, la RB73 2577 de interés para algunas regiones cañeras del Brasil y la Mex79 431 con las que se han realizado algunas pruebas en Cuba y ocupa el 15 % en la composición varietal del ingenio Santa Ana de Guatemala.

El diseño experimental utilizado fue el de parcela dividida, las que estaban conformadas por 3 surcos de 6,5 m de largo, evaluándose dos tratamientos con 3 réplicas.

Los ensayos se montaron en suelos Mollic Eutrustept según clasificación de Hernández et al. (1996, 1999) y de Soil Survey Staff. Soil Taxonomy (1999), siendo estos suelos de alta fertilidad, pertenecientes al Ingenio Santa Ana en la República de Guatemala.

En todos los ensayos se realizaron aplicaciones de fertilizante fórmula completa en el momento de la siembra, a razón de 75 kg/ha de Nitrógeno, 50 kg/ha de fósforo (P_2O_5) y Potasio (K_2O) a razón de 50 kg/ha; y 75 kg de nitrógeno en forma de urea a los tres meses de plantados, según la metodología propuesta por Jiménez *et al.* (1995). El ensayo fue sembrado en marzo de 2007 y se cosechó para ser evaluado a los 13 meses (abril de 2008).

Para el primer tratamiento fueron utilizadas las plantas propagadas en los SIT del experimento 3.4, las que se sembraron a una distancia de 1.20 m por 0.60 m (10 plantas por surco), realizándose 2 riegos semanales durante el primer mes de sembradas.

Para el segundo tratamiento se utilizaron estacas tradicionales de tres yemas y la densidad de siembra fue de 12 yemas por metro lineal, Jiménez *et al.* (1995), sometándose a tratamiento térmico por hidrotermoterapia a 50.5 °C durante dos horas (Chinea y Pérez, 1997; Piñón, 2001).

Se cuantificó el número de tallos por metro lineal, el número de yemas por tallo y por plantón, el diámetro (mm) y altura de los tallos (cm), se determinaron las toneladas de caña por hectárea (TCH) y toneladas de azúcar por hectárea (TAH), para ello se cortaron 4 m lineales por cada parcela (2 muestras de 2 m), pesando las muestras completas con un dinamómetro de campo. Las toneladas de azúcar por hectárea (TAH) fueron

determinadas en el laboratorio del Ingenio Santa Ana, donde se molieron dos muestras por parcela.

Para el procesamiento estadístico de los resultados del experimento realizado se empleó la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico de SPSS/PC versión 18 para Windows.

Resultados

y

Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Influencia de la presión de aire en los S.I.T. sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas *in vitro*

La liberación o no de la presión de aire en los vasos de cultivo después de la inmersión tuvo una incidencia directa sobre la capacidad de multiplicación y la morfología de las plantas cultivadas *in vitro* (Figura 6).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos configuraciones de SIT estudiadas, para las variables número total de plantas producidas por SIT y el coeficiente de multiplicación.

Como se observa en la Tabla 1, el mayor número de plantas producidas por SIT y el mayor coeficiente de multiplicación se manifestó en los SIT donde se libera la presión de aire al terminar el proceso de inmersión.

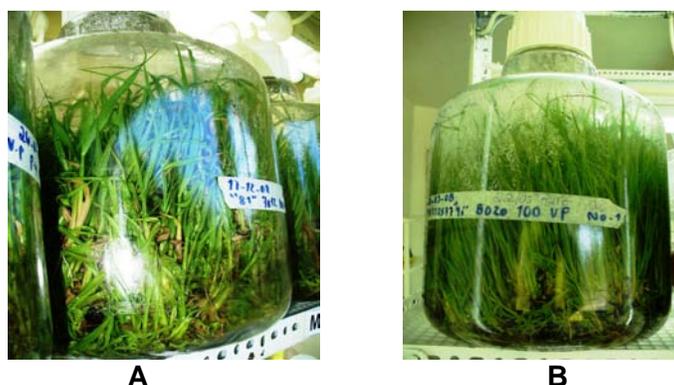


Figura 6. Producción de biomasa vegetal y características morfológicas de las plantas propagadas en las dos configuraciones SIT, A: Con presión de aire, B: Sin presión de aire

Tabla 1. Influencia de la presión de aire en los SIT sobre el número total de plantas producidas y el coeficiente de multiplicación

	SIT con presión			SIT sin presión		
	\bar{X}	E.E	Rangos medios	\bar{X}	E.E	Rangos medios
No. total de plantas producidas/SIT	4120.1 \pm 17.25		45.0 b	4594.4 \pm 16.65		126.0 a
Coeficiente de multiplicación	82.2 \pm 17.90		45.0 b	92.3 \pm 16.65		126.0 a

*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Las variables morfológicas (longitud del tallo, grosor del tallo, ancho de las hojas y porcentaje de plantas con raíz) manifestaron sus mejores resultados estadísticos cuando no existió presión dentro de los vasos de cultivo en los SIT. No así con el número y longitud de las hojas, que no expresaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2), mientras que el mayor porcentaje de plantas deformadas (Figura 7) se observó en los SIT con presión.

Tabla 2. Efecto de la presión de aire en los SIT sobre la morfología de las plantas producidas

SIT con presión	\bar{X}	E.E	Rangos medios	SIT sin presión	\bar{X}	E.E	Rangos medios
Longitud del Tallo (cm)	8.9 ±0.11		47.00 b	Longitud del Tallo (cm)	12.8 ±0.17		124.00 a
Grosor del tallo (mm)	0.4 ±0.012		59.50 b	Grosor del tallo (mm)	0.5 ±0.010		111.50 a
Ancho de las hojas	0.3 ±0.008		54.00 b	Ancho de las hojas	0.5 ±0.015		117.00 a
% de plantas con raíz/SIT	55.6 ±0.26		46.00 b	% de plantas con raíz/SIT	62.5 ±0.26		125.00 a
Número de hojas	3.2 ±0.04		81 n.s.	Número de hojas	3.3 ±0.05		90 n.s.
Longitud de las hojas	11.5 ±0.14		64 n.s.	Longitud de las hojas	12.7 ±0.11		107 n.s.
% de plantas deformadas/SIT	2.29 ±0.03		124.00 a	% de plantas deformadas/SIT	1.55 ±0.02		47.00 b

*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney



Figura 7. Plantas mostrando un desarrollo normal (A) y plantas deformadas (B)

El efecto directo de la presión de aire en los vasos de cultivo sobre las células y tejidos de plantas cultivadas en medios de cultivo líquidos aún no ha sido esclarecido, aunque se reconoce que el incremento de la misma puede afectar la morfología de las células y tejidos.

En el cultivo de células en biorreactores el aumento de la presión de aire usualmente incrementa la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. La práctica de incrementar la presión a 5-10 p.s.i. no solamente reduce los riesgos de contaminación (por fugas en el vaso), sino que casi duplica el equilibrio de oxígeno disuelto en el medio de cultivo líquido (Curtis, 2005). En los SIT debido a que el medio de cultivo solo entra al vaso de cultivo donde están las plantas de manera intermitente, la influencia que pueda tener la presión de aire sobre el contenido de oxígeno en la atmósfera no deber ser el factor primario responsable de los cambios en la morfología de las plantas.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento probablemente tengan su mejor explicación en la diferente composición de otros gases como el etileno y el CO₂ que se logra en las dos configuraciones de SIT ensayadas. En los SIT donde no se libera la presión de aire no hay renovación de la atmósfera hasta la siguiente inmersión que ocurre 6 horas más tarde; mientras que en los SIT con liberación de la presión hay una constante renovación pasiva de la atmósfera.

Desde hace algún tiempo se ha reconocido que el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* puede ser afectada por la composición de la atmósfera gaseosa (Jackson et al., 1987; Blazková et al., 1989; Kozai et al., 1986, 1989 y 1991).

El ambiente gaseoso dentro de los vasos de cultivo sin intercambio es anormal en comparación con el ambiente *ex vitro*. Las principales características del ambiente *in vitro* son la elevada humedad relativa, las fluctuaciones diurnas en la concentración de CO₂ y la acumulación de etileno y otras sustancias tóxicas (Kubota y Kozai, 1992). Como consecuencia de ello la fotosíntesis, la transpiración y la toma de agua, nutrientes y CO₂ pueden ser reprimidas y se estimula la respiración, lo que resulta en un pobre crecimiento (Jeong et al., 1995) y la aparición de desórdenes fisiológicos y morfológicos en las plantas *in vitro* (Debergh y Maene, 1984); los cuales incluyen cambios morfogénicos indeseables que son muy variados y dependen de la especie (Jackson et al., 1987).

El objetivo principal de ventilar los vasos de cultivo es mejorar el ambiente gaseoso y minimizar las diferencias entre el ambiente *in vitro* y el *ex vitro*. Las plantas cultivadas *in vitro* liberan una variedad de sustancias que pueden acumularse y tener efectos significativos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Heyser y Mott, 1980). El producto gaseoso de las plantas más ampliamente estudiado es el etileno.

El etileno es un compuesto volátil que ha recibido considerable atención por su efecto como regulador del crecimiento de las plantas. Se conoce que el etileno tiende a acumularse en los vasos de cultivo, especialmente cuando el intercambio de aire es limitado y esta acumulación es asociada con varias respuestas fisiológicas de las plantas cultivadas *in vitro*, tales como inducción de epinastia (Zobayed et al., 2001), fotosíntesis reducida (Zobayed et al., 1999), senescencia de las hojas y disminución del crecimiento (Jackson et al., 1991).

Los cultivos *in vitro* pueden verse afectados por la acumulación de etileno y provocar por ejemplo en una pobre diferenciación celular (Miller y Roberts, 1984), ausencia de embriogénesis somática (Meijer y Brown, 1988; Purnhauser et al., 1987; Roustan et al., 1989), disminución de la altura de los brotes y del área de las hojas (Jackson et al., 1987 and 1991) o pobre proliferación y crecimiento de los callos (Adkins et al., 1990 and 1993).

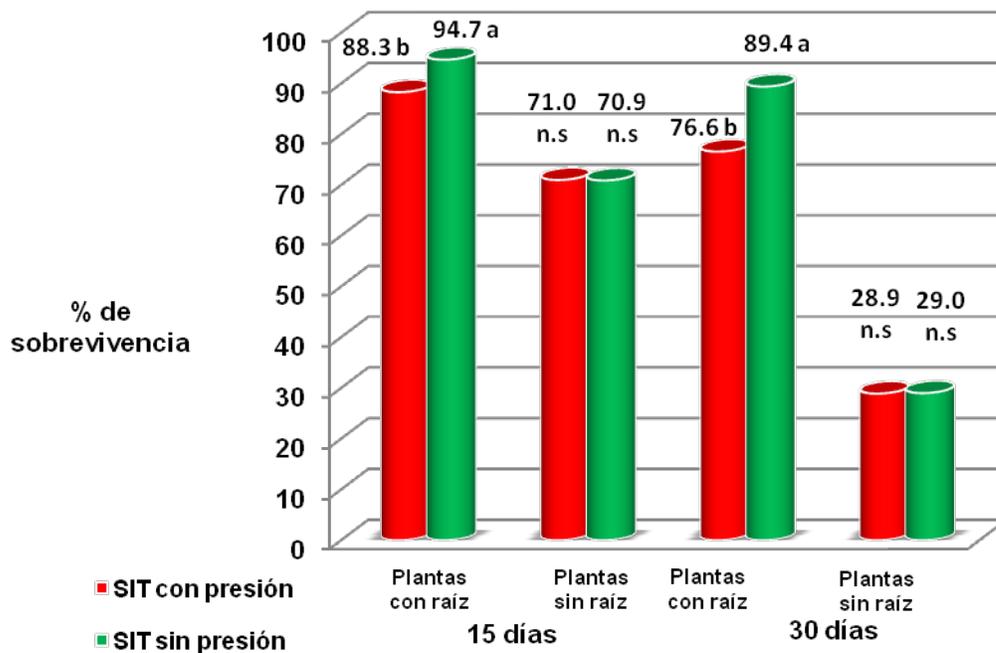
La acumulación de etileno en los vasos de cultivo puede ser responsable también de la hiperhidricidad o desarrollo anormal en un número de especies (Jackson et al., 1991). El intercambio de gases de los vasos afecta la concentración de etileno y por tanto, cuando hay ventilación forzada el etileno no se acumula debido a que es constantemente eliminado del vaso.

Zobayed (2005), describe también que al emplear vasos ventilados (ventilación pasiva o forzada) la falta de CO₂ durante el foto período puede ser reducida considerablemente y dependiendo del tamaño de las plántulas, las concentraciones pueden mantenerse cercanas a la concentración atmosférica, lo que no ocurre en los SIT donde se mantiene la presión interna y no hay intercambio gaseoso entre las inmersiones. Por otro lado la ventilación pasiva o forzada de los vasos puede reducir de manera adecuada la acumulación de CO₂ durante el período de oscuridad.

En los sistemas sin intercambio o con intercambio limitado la acumulación de etileno resulta en un contenido bajo de clorofila en las hojas. El contenido de clorofila puede

incrementarse significativamente mediante el empleo de ventilación forzada (Zobayed (2005) y esto conjuntamente con la mayor disponibilidad de CO₂ incrementar las tasas de fotosíntesis y el incremento del rendimiento en biomasa y multiplicación de los brotes.

En la Figura 8 se observa que las plantas con raíces procedentes de los SIT donde no existió presión de aire en el interior de los frascos presentaron un mayor porcentaje de sobrevivencia cuando fueron transferidas a fase de aclimatización, tanto a los 15 como a los 30 días después del trasplante. Esto tiene su explicación en que las plantas producidas en los SIT sin presión presentaban un mayor y mejor desarrollo morfológico.



* Rangos medios con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Figura 8. Sobrevivencia de las plantas a los 15 y 30 días de trasplantadas a la fase de aclimatización

Los mayores porcentajes de pérdidas de las plantas en la fase de aclimatización en las plantas sin raíz para ambas configuraciones de SIT se presentaron entre los 15 y los 30 días después de trasplantadas, momento en que se realizó el segundo muestreo. A partir de ese momento no se produjeron nuevas pérdidas en ninguno de los tratamientos.

Esto puede estar dado ya que en la fase de aclimatización en la caña de azúcar se pueden establecer dos etapas bien diferenciadas, un período de lento crecimiento con baja formación de raíces y número de hojas, en el cual las plántulas realizan sus funciones a expensas de las reservas adquiridas en la fase *in vitro*; la otra etapa es caracterizada por un crecimiento rápido, asociado a una nueva emisión del sistema radical y a la formación de hojas con características normales, lo que reafirma los resultados obtenidos en la etapa de aclimatización por Rodríguez *et al.* (2003) y por Pelhare *et al.* (2004) en estudios realizados sobre plantas de caña de azúcar y *Eucalyptus urograndis* respectivamente, provenientes de SIT.

Los resultados obtenidos en este acápite permiten concluir que la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo) indujo un mejor desarrollo morfológico de las plantas y coeficientes de multiplicación que los SIT donde se mantiene la presión de aire (sin intercambio), lo que también se reflejó en una mayor sobrevivencia de las plantas cuando son trasplantadas a la fase de aclimatización.

4.2. Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT

Como se observa en la Tabla 3 al comparar el tratamiento con eliminación de la etapa de elongación con el protocolo descrito por Lorenzo *et al.*, (1998) para la propagación de caña de azúcar en los SIT, los mejores resultados en cuanto al número total de plantas producidas por SIT y el coeficiente de multiplicación se lograron en este último. Estas diferencias deben estar dadas por la presencia de PBZ como regulador del crecimiento utilizado en el medio de cultivo de multiplicación propuesto por Lorenzo *et al.*, (1998), ya que éste compuesto constituye un importante inhibidor de la síntesis de giberelina.

Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Ziv., (1995), Lorenzo *et al.* (1997, 1999), Marrero *et al.*, (1998) y Albany *et al.* (2005) los que plantean que cuando se emplea PBZ en los medios de cultivos de multiplicación en los SIT en las concentraciones adecuadas, se produce un incremento en la producción de brotes, lo cual está relacionado con un mejor metabolismo de las citoquininas.

Tabla No 3. Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT y su influencia sobre el número total de plantas producidas y el coeficiente de multiplicación

Con fase de elongación	\bar{X}	E.E	Rangos medios	Sin fase de elongación	\bar{X} E.E	Rangos medios
No. total de plantas producidas/SIT	4615 ± 16.65		126.00 a	No. total de plantas producidas/SIT	3803 ± 18.2	45.00 b
Coeficiente de multiplicación	92.3 \pm 0.33		126.00 a	Coeficiente de multiplicación	76.1 ± 0.36	45.00b

*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Las plantas con mejores caracteres morfológicos se desarrollaron en los SIT cuando no se utilizó PBZ en el medio de cultivo de multiplicación y se eliminó la fase de elongación, tal como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT y su influencia sobre las características morfológicas de las plantas propagadas

Con fase de elongación	\bar{X}	E.E	Rangos medios	Sin fase de elongación	\bar{X}	E.E	Rangos medios
Longitud del Tallo (cm)	12.8 ± 0.17		45.0 b	Longitud del Tallo (cm)	17.5 ± 0.14		126.0 a
Grosor del tallo (cm)	0.6 ± 0.010		59.0 b	Grosor del tallo (cm)	07 ± 0.012		112.5 a
Ancho de las Hojas (cm)	0.5 ± 0.015		54.0 b	Ancho de las Hojas (cm)	0.7 ± 0.011		117.0 a
Número de hojas	3 ± 0.05		55.5 b	Número de hojas	4 ± 0.08		115.5 a
Longitud de las hojas	15.5 ± 0.17		64.0 b	Longitud de las hojas	19.8 ± 0.14		107.0 a
% de plantas con raíz/SIT	62.2 ± 0.26		45.00 b	% de plantas con raíz/SIT	95.0 ± 0.34		126.00 a
% de plantas deformadas/SIT	1.6 ± 1.06		126.00 a	% de plantas deformadas/SIT	0.22 ± 0.34		45.00 b

*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Los mayores valores de longitud del tallo, grosor del tallo, ancho de las hojas, número y longitud de las hojas y porcentaje de plantas enraizadas se obtuvieron en el medio de cultivo de multiplicación sin PBZ y sin fase de elongación (Tabla 4). Este compuesto químico se encuentra entre los compuestos triazólicos inhibidores de la síntesis de giberelina, los que han sido utilizados ampliamente en la agricultura para el control del crecimiento de las plantas, así como para lograr la disminución de la longitud y número de raíces (Aron et al., 1985; Early y Martín., 1988); Beausher y Yelenosky., 1987). Los niveles de enraizamiento alcanzados en cada variante pueden observarse en la Figura 9.



Figura 9. Diferencias en el enraizamiento en plantas producidas en medio de multiplicación con PBZ y fase de elongación (A) y en medio de multiplicación sin PBZ y eliminando la fase de elongación

Por otro lado el mayor porcentaje de plantas deformadas se puso de manifiesto en los SIT que se utilizó el medio de cultivo de multiplicación que contiene PBZ y se mantuvo la fase de elongación (Tabla 4), lo que provocó altos coeficientes de multiplicación, que se traducen en altos volúmenes de plantas cultivadas *in vitro* dentro de los vasos de cultivo, lo que sustenta lo planteado por diversos autores, quienes han manifestado que con el uso de los SIT se logran elevados niveles de proliferación durante la etapa de multiplicación en diferentes especies vegetales (Lorenzo *et al.*, 1998; Aragón *et al.*, 2005; Castro y González - Olmedo, 2005; Molina *et al.*, 2005; Peñate *et al.*, 2007).

El elevado número de plantas finales en los SIT ocasionó un hacinamiento de plantas dentro de los vasos de cultivo, lo que le impide un buen desarrollo morfológico y fisiológico dando lugar a plantas deformadas y cloróticas, no sucediendo esto cuando en

la formulación del medio de cultivo no fue adicionado el PBZ y se eliminó la etapa de elongación, siendo inferior en este caso el porcentaje de plantas atípicas y con características morfológicas no adecuadas a las establecidas para las plantas cultivadas *in vitro*. Esto está dado por la posibilidad que se tiene de poder controlar y variar las propiedades físico-químicas en el ambiente de los frascos de cultivo en los SIT (Cejas *et al.*, 2005).

En la Figura 10 se puede observar la calidad de las plantas obtenidas en los SIT de la primera variante con PBZ y manteniendo la etapa de elongación, así como las plantas obtenidas en la segunda variante sin PBZ y eliminando la etapa de elongación.



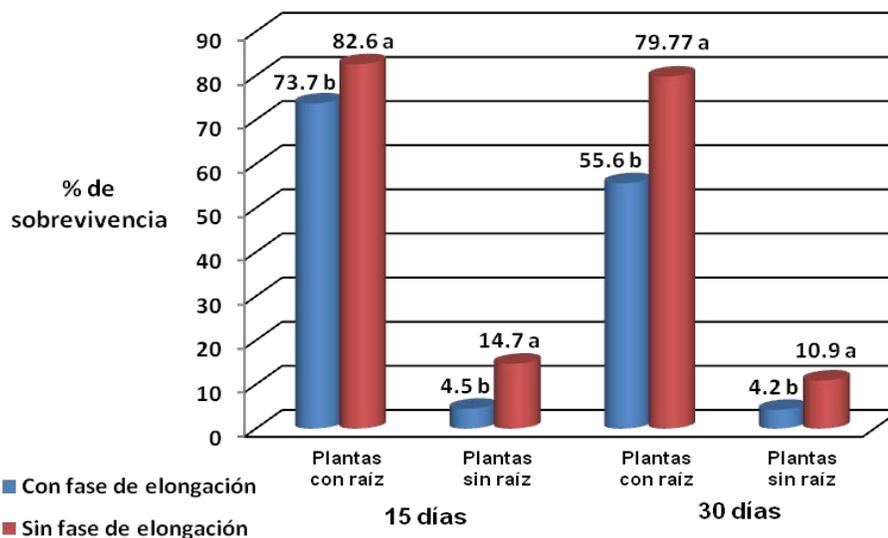
Figura 10. Plantas obtenidas en los SIT con PBZ y la etapa de elongación y plantas obtenidas sin PBZ y eliminando la etapa de elongación en los SIT

Los retardadores del crecimiento, que a la vez son inhibidores de la síntesis de giberelina, entre los que se encuentra el PBZ, ejercen un control en el crecimiento de las plantas, según lo planteado por algunos autores (Aron *et al.*, 1985; Beausher y Yelenosky, 1987; Early y Martín, 1988). Los resultados obtenidos en el experimento también corroboran la influencia que ejerce el PBZ en la propagación *in vitro* sobre la reducción del

área foliar y la disminución del crecimiento y grosor de los tallos y hojas (Ziv, 1989; Werbrouck y Debergh, 1995; Werbrouck *et al.*, 1996; Ziv *et al.*, 1998 y Albany, 2001).

Estos resultados que se presentan en la Tabla 4 indican que con la segunda variante experimental utilizada, se puede prescindir de la fase de elongación y lograr con ello una disminución del tiempo de duración del proceso de propagación, a la vez que se incrementa la calidad de las plantas producidas.

Los resultados obtenidos en la fase de aclimatización muestran la importancia de la calidad de las plantas obtenidas en la fase de enraizamiento para la efectividad en el restablecimiento a las condiciones *ex vitro*. Las diferencias significativas entre las plantas cultivadas en los SIT sin la fase de elongación con respecto a la variante donde se procedió a realizar ésta, son marcadas (Figura 11). Los valores de sobrevivencia obtenidos en todos los casos (plantas con raíz y plantas sin raíz) son superiores donde se multiplicaron las plantas sin PBZ y se eliminó la etapa de elongación, tanto en las evaluaciones realizadas a los 15 como a los 30 días.



* Rangos medios con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Figura 11. Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT y su influencia sobre la sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatización

Evidentemente la fisiología del crecimiento y el desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* guardan estrecha relación con la capacidad de sobrevivencia y el vigor en el crecimiento durante la fase de aclimatización. Esto es sustentado por los estudios realizados por

Daniels (1997), quien evaluó diferentes poblaciones de plantas cultivadas *in vitro* de papa procedentes de ápices y diferentes entrenudos con diferencias entre ellas desde la fase *in vitro* hasta la plantación en campo, así como por los resultados alcanzados por Rodríguez *et al.* (2000) y por Pelhare *et al.* (2004) en estudios realizados sobre plantas de caña de azúcar y *Eucalyptus urograndis* respectivamente, provenientes de SIT.

El análisis anterior demuestra que en el proceso de micropropagación a nivel comercial es de gran importancia el conocimiento de las diferencias que se presentan en la respuesta de las plantas cultivadas *in vitro*, ya que a partir de sus características morfológicas y antes de llevarlas a las casas de cultivo y en especial a condiciones de campo es necesario realizar manejos específicos para lograr homogeneidad en las poblaciones en la aclimatización y posteriormente en campo, Pérez *et al.*, (1998), Jiménez *et al.*, (2000).

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que en la propagación de la caña de azúcar en SIT, el último subcultivo de multiplicación debe realizarse sin adicionar PBZ al medio de cultivo y a la vez eliminar la fase de elongación. Con este manejo es posible reducir el tiempo en el esquema de propagación y a la vez incrementar la calidad de las plantas producidas y su posterior sobrevivencia en la fase de aclimatización.

4.3 Efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo

En este ensayo, como se puede observar en la Tabla 5, los mejores resultados estadísticos sobre el número total de plantas producidas, se lograron en el tratamiento con una densidad de inóculo de 40 brotes por frasco y un tiempo de cultivo de 50 días. Por lo tanto con esta combinación se logró la mejor utilización de la capacidad del vaso de cultivo, es decir valorando los resultados obtenidos en términos productivos, se alcanzó con esta combinación un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada en las cámaras de cultivo, permitiendo manejar un mayor número de explantes por área física de las cámaras de cultivo.

El efecto de la densidad de inóculo sobre la producción final de brotes en plantas de caña de azúcar propagadas en SIT, fue estudiado por de Feria *et al.*, 1998, quienes demostraron que al emplear 40 brotes por frasco como inóculo inicial se logra la mayor cantidad de brotes por unidad de SIT (437) y una producción de biomasa de 251 g.

Tabla No 5. Efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo en los SIT sobre el número total de plantas producidas y la formación de raíces

A	\bar{X}	E.E	Rangos medios	B	\bar{X}	E.E	Rango s medios
No. total de plantas producidas/SIT	1480	±16.6	45.0 b	No. total de plantas producidas/SIT	2622	±18.5	126.0 a
Coefficiente de multiplicación	37	±0.41	45.0 b	Coefficiente de multiplicación	52	±0.35	126.0 a

*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

A: Densidad de inóculo (35 explantes) y tiempo de cultivo (40 días), B: Densidad de inóculo (40 explantes) y tiempo de cultivo (50 días)

Según Jiménez (1995); Lorenzo *et al.*, 1998; de Feria *et al.*, 1998 y Castro *et al.*, (2001 y 2002) y Posada L. *et al.*, 2003, desde el punto de vista de la calidad de los brotes y el coeficiente de multiplicación, los SIT estimulan un mejor comportamiento de las plantas cultivadas *in vitro*, estos autores incrementaron el coeficiente de multiplicación en caña de azúcar al emplear SIT en la fase de multiplicación. En este experimento, tal como se puede apreciar en la Tabla 5, el mayor valor del coeficiente de multiplicación se obtuvo también con la combinación donde la densidad de inóculo fue de 40 plantas y 50 días de cultivo.

Los resultados obtenidos demostraron que con los coeficientes de multiplicación alcanzados en los SIT es posible eliminar la fase de elongación, disminuir el tiempo del ciclo de producción y aumentar las capacidades productivas de la instalación, lo cual redundaría en un aumento de la productividad de la Biofábrica y un decrecimiento de los costos de producción, corroborando lo planteado por Jiménez *et al.*, (1998 y 1999), Pérez *et al.*, 1998 y de Feria *et al.*, 2000, quienes demostraron que con el empleo de los SIT en la micropropagación se amplían las capacidades productivas de los laboratorios de cultivo de tejidos.

Por otra parte los resultados de este estudio demostraron que junto con la densidad de inóculo, el ritmo y el tiempo de inmersión de los explantes, los que han sido abordados con anterioridad por algunos autores (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1994, Jiménez, 1995, Lorenzo *et al.* (1998), Pérez *et al.*, (1998), de Feria *et al.*, 1998, Posada L. *et al.*, 2003, Mordocco A. *et al.*, 2008) en los SIT en medio líquido, es necesario tener en

cuenta otros parámetros morfológicos de las plantas, sobre los que influyen la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo.

En los resultados que se muestran en la Tabla 6 se puede observar el efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo sobre estas características morfológicas de las plantas cultivadas en los SIT.

Todas las variables estudiadas mostraron diferencias altamente significativas a favor de las plantas cultivadas *in vitro* en los SIT, donde la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo tuvieron una notoria influencia en la longitud de los tallos (cm), grosor del tallo (cm), ancho de las hojas (cm), número y longitud de las hojas, expresándose los mejores resultados cuando se utilizó una densidad de inóculo de 40 explantes y el tiempo de cultivo fue de 50 días.

Tabla 6. Efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo sobre las características morfológicas de las plantas cultivadas en los SIT

A	\bar{X}	Rangos medios	B	\bar{X}	Rangos medios
Longitud del Tallo (cm)	13.1 ±9.29	45.0 b	Longitud del Tallo (cm)	18.5 ±19.11	126.0 a
Grosor del tallo (cm)	0.6 ±15.65	59.0 b	Grosor del tallo (cm)	0.7 ±19.90	112.5 a
Ancho de la Hoja (cm)	0.4 ±0.014	54.0 b	Ancho de la Hoja (cm)	0.7 ±0.011	117.0 a
Número de hojas	3 ±0.05	55.5 b	Número de hojas	4 ±0.08	115.5 a
Longitud de las hojas	14.9 ±0.16	64.0 b	Longitud de las hojas	19.6 ±0.14	107.0 a
% de plantas con raíz	91.0 ±15.2	45.0 b	% de plantas con raíz	97.3 ±18.1	126.0 a
% de plantas deformadas	1.8 ±1.05	n.s	% de plantas deformadas	1.7 ±1.07	n.s

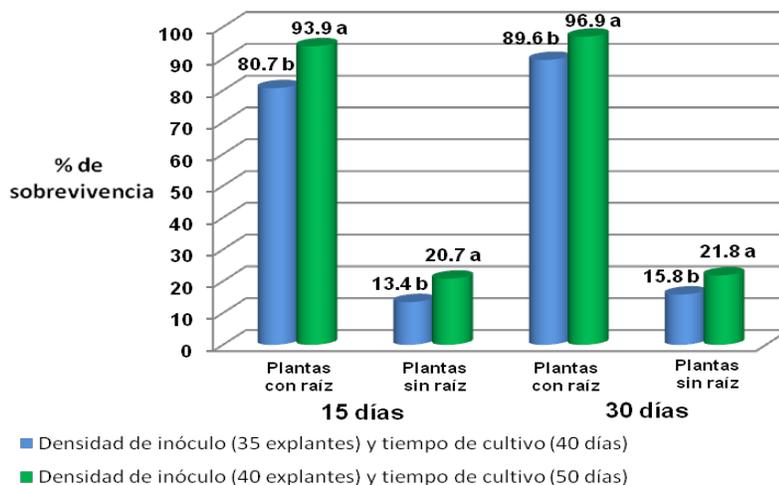
*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

A: Densidad de inóculo (35 explantes) y tiempo de cultivo (40 días), B: Densidad de inóculo (40 explantes) y tiempo de cultivo (50 días)

Siendo esto posible al existir un buen balance entre el número de explantes iniciales, el tiempo de cultivo y el volumen de los vasos de cultivos. Resultados similares obtuvo Ramírez (2000), cuando estudió en caña de azúcar el comportamiento del coeficiente de multiplicación en tres tipos de frascos con diferentes volúmenes, aunque empleando medio de cultivo líquido estático. Por otra parte Ziv (1995), realizó estudios sobre brotes que crecen en frascos pequeños, estos están expuestos a un limitado potencial hídrico y osmótico en el medio de cultivo y un limitado intercambio de CO₂ y O₂.

Por su parte los SIT donde se utilizan frascos de mayor volumen suministran a los explantes mejores condiciones de cultivo para su crecimiento, pues las plantas al estar en contacto con el medio de cultivo con una determinada frecuencia y por un corto período de tiempo, permite una mayor renovación de la atmósfera interna del frasco, lo que mejora la oxigenación de los tejidos y por ende un mejor desarrollo morfológico de las plantas cultivadas *in vitro*.

El porcentaje de sobrevivencia es un indicador muy importante en la fase de aclimatización, pues de él depende la cantidad de plantas que pueden llevarse al campo posteriormente. La Figura 12 muestra las plantas que fueron transferidas a la fase de aclimatización observándose que en las evaluaciones realizadas a los 15 y 30 días de esta etapa mostraron una mayor significación estadística las plantas que presentaban raíces, esto está dado lógicamente a que estas plantas presentan un mejor desarrollo morfológico y fisiológico para su adaptación a estas condiciones (L. García-Águila, 2007).



*Rangos medios con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Figura 12. Efecto de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo sobre el porcentaje de sobrevivencia de las plantas en fase de aclimatización

A partir de los 15 días se observó una ascendente evolución en el comportamiento de las plantas en la fase de aclimatización, poniéndose de manifiesto en todos los casos un descenso del porcentaje de pérdidas entre la primera evaluación a los 15 días y la segunda a los 30 días del trasplante, no produciéndose mortalidad a partir de ese momento, esto puede estar dado al igual que explicamos en experimentos anteriores por las dos etapas bien diferenciadas que transcurren las plantas en la etapa de aclimatización estudiadas por Rodríguez *et al.* (2000) y por Pelhare *et al.* (2004) en estudios realizados sobre plantas de caña de azúcar y *Eucalyptus urograndis* respectivamente, provenientes de SIT, donde se pone de manifiesto un período de lento crecimiento con baja formación de raíces y número de hojas y otro donde las plantas manifiestan un crecimiento rápido.

Por otra parte esta figura 14 nos muestra que los mejores resultados de sobrevivencia proceden de la variante donde se inocularon 40 explantes y permanecieron en el ciclo de cultivo por 50 días. Como planteamos en el experimento 4.2 este comportamiento es sustentado por los estudios realizados por Daniels (1997), quien evaluó diferentes poblaciones de plantas cultivadas *in vitro* de papa procedentes de ápices y diferentes entrenudos con diferencias entre ellas, desde la fase *in vitro* hasta la plantación en campo, además estas diferencias fueron observadas en la fase de aclimatización y posteriormente en campo, Pérez *et al.*, (1998) en plantas *in vitro* de plátanos y bananos; Jiménez *et al.*, (2000) en aclimatización de plantas *in vitro* y producción de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum L.*) y en caña de azúcar por Marrero *et al.*, (1996).

4.4 Escalado de la propagación en sistemas de inmersión temporal en 3 genotipos de caña de azúcar

Se realizó el escalado de la propagación en SIT, aplicando los mejores resultados obtenidos en los acápite anteriores de este trabajo de tesis (configuración de SIT con liberación de la presión, eliminación de la fase de elongación y densidad de inóculo de 40 explantes y 50 días de cultivo) en tres genotipos de caña de azúcar: la variedad CP72 2086 con la cual se realizaron los ensayos previos y las variedades RB73 2577 y Mex79 431.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de las variables evaluadas en las plantas propagadas en los SIT en las tres variedades. El número total de plantas producidas por

SIT y los coeficientes de multiplicación logrados en la variedad Mex79 431 fueron similares a los obtenidos con la CP72 2086, mientras que en la RB73 2577 fueron superiores.

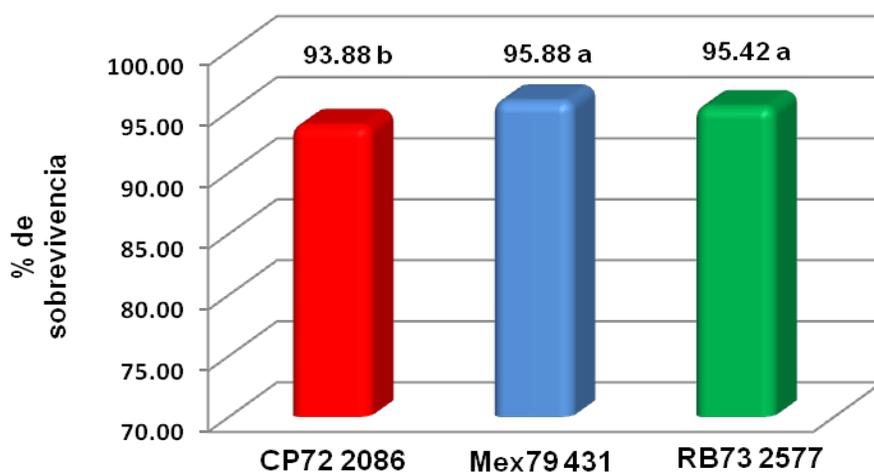
Tabla 7. Total de plantas producidas, coeficiente de multiplicación y características morfológicas de las plantas propagadas *in vitro* en SIT en tres genotipos de caña de azúcar

Variedades	Número total de plantas/SIT	Coefficiente de multiplicación	% de plantas con raíz	Longitud del tallo (cm)	Grosor del tallo (mm)
CP72 2086	2622.44 b	52.55 b	97.30 b	57.66 b	236.33 n.s.d
Mex79 431	2704.22 b	54.22 b	97.70 ab	107.77 ab	227.88 n.s.d
RB73 2577	2910.89 a	59.66 a	98.29 a	121.55 a	199.00 n.s.d
E. S.	± 73.104	± 1.58	± 73.655	± 24.108	± 47.177

*Rangos medios con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Las tres variedades propagadas difirieron estadísticamente en cuanto al número de plantas con raíz y la longitud del tallo (cm), mientras que para la variable grosor del tallo (cm) no se presentaron diferencias (Tabla 7).

La Figura 13 muestra los porcentos de sobrevivencia alcanzados en las plantas de las tres variedades cuando son transferidas a la fase de aclimatización. En las variedades MEx79 431 y RB73 2577 la sobrevivencia de las plantas fue mayor que en la CP72 2086, con valores superiores al 95 %.



*Rangos medios con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Tuckey

Figura 13. Sobrevivencia a los 15 días en la fase de aclimatización de tres genotipos de caña de azúcar propagados *in vitro* en SIT

Los resultados obtenidos en este ensayo permiten avalar la factibilidad de las mejoras introducidas en la propagación en SIT en los anteriores acápite de este trabajo. Fue posible propagar con efectividad otras dos variedades de caña de azúcar, lográndose tasas de multiplicación y parámetros de calidad morfológica y sobrevivencia de las plantas en aclimatización similares o superiores a las obtenidas en CP72 2086.

Una vez validados los resultados de las mejoras en la metodología de propagación en SIT en estos tres genotipos se procedió a la introducción de las mismas a escala de producción, la cual se realizó en tres laboratorios comerciales, estos fueron la Biofábrica de Caña de Azúcar perteneciente al Ingenio Santa Ana en la República de Guatemala, la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez”, perteneciente al Centro de Tecnología Estratégica del Nordeste, Pernambuco, Brasil y la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Cuba).

En la Figura 14 se muestran datos de producción (acumulados totales y por genotipo) de la Biofábrica del Ingenio Santa Ana en Guatemala, correspondientes a los años 2004 al 2009.

En la etapa comprendida entre el 2004 y el 2006 las cifras corresponden a la producción de plantas en SIT mediante la utilización del protocolo previamente descrito por Lorenzo

et al., (1998), realizándose los cambios tecnológicos en los estantes y la eliminación de la etapa de elongación a partir del período productivo 2006 - 2007.

Como se observa en esta Figura 14 a partir del 2006 - 2007 aumentan significativamente los volúmenes totales de plantas producidas por año, lográndose en la campaña 2008 - 2009 incrementar en más del doble (2.3 veces) la producción del 2004 - 2005 con la misma capacidad tecnológica instalada.

Las producciones anuales alcanzadas permiten satisfacer las demandas de semilla certificada de la empresa en estos tres genotipos de caña de azúcar y se introducen en estos momentos en el proceso productivo otros genotipos de interés comercial, tales como la CG96 40, CG98 10, CG00 120, PR75 2002 y la CP88 1508 .

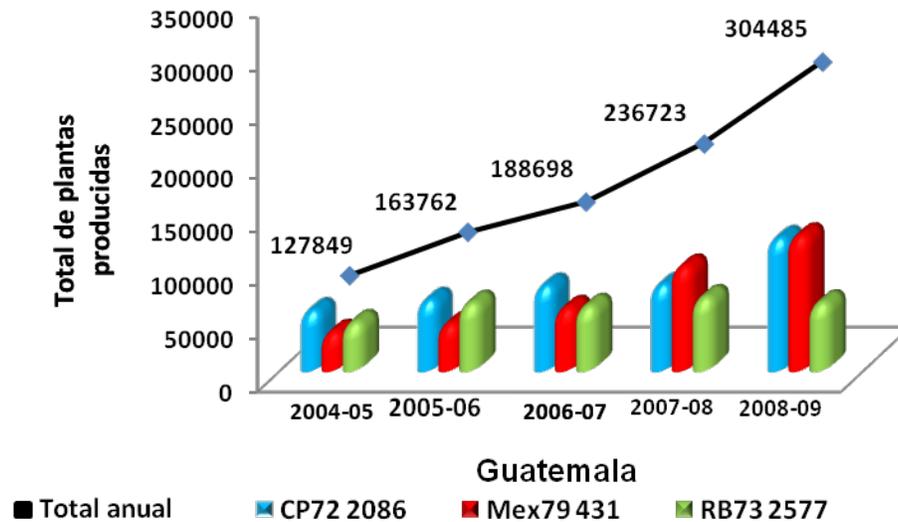


Figura 14. Datos de producción de plantas de caña de azúcar en SIT en la Biofábrica del Ingenio Santa Ana en Guatemala, correspondientes a los años 2004 al 2009

Resultados exitosos de la introducción de estas mejoras en el proceso de propagación fueron obtenidos en la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez”, perteneciente al Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste, Pernambuco, Brasil y la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Cuba) con los genotipos RB73 2577 y Mex79 431 respectivamente, durante las campañas 2007 - 2008 y 2008 - 2009 (Figura 15).

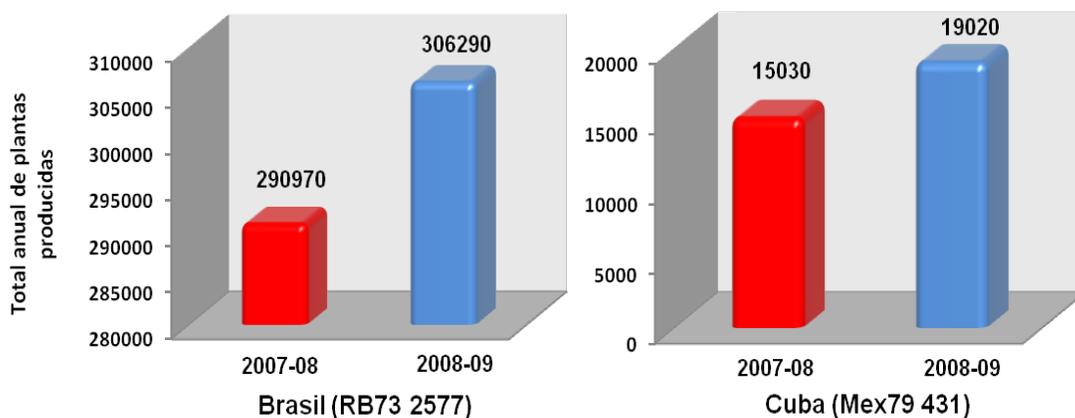


Figura 15. Producción anual de plantas de caña de azúcar en SIT en la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez” del Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste (Brasil) y la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Cuba)

Los resultados obtenidos permiten concluir que la combinación de la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo), la eliminación de la fase elongación y los ajustes en la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo condujo al logro de mejores resultados productivos, puesto que a partir de los años en que se comenzó la introducción de las mejoras tecnológicas se produjo un incremento considerable del total de plantas obtenidas por SIT, así como mejores rendimientos biológicos, por lo que se considera que estos resultados pueden ser utilizados para la producción de plantas vía organogénesis a escala masiva en otros genotipos de caña de azúcar, ofreciendo la posibilidad de una mayor automatización de algunas etapas del proceso de micropropagación.

Además esto corrobora que los SIT ofrecen mayor facilidad de escalado, reducción de los costos de producción, incluyendo una reducción drástica del trabajo, con la finalidad de producir grandes volúmenes de plantas (Teisson *et al.*, 1996, Jiménez y de Fera, 1998 y Bernal *et al.*, 2002) y sobre todo en la micropropagación *in vitro* de la caña de azúcar, puesto que en este cultivo se han utilizado ampliamente con vistas a su aplicación comercial (Etienne *et al.*, 2002)

La Inmersión Temporal es un procedimiento relativamente nuevo de la micropropagación que permite lograr incrementos significativos del coeficiente de multiplicación y disminuye la manipulación del material vegetal por el hombre, lográndose un elevado grado de automatización en el proceso (Alvard *et al.*, 1993). Es por lo anterior que es necesario continuar buscando nuevas alternativas en la producción masiva de la caña de azúcar,

sobre todo en la disminución de los costos y el aumento de la productividad mediante la automatización del proceso.

4.5 Comportamiento en campo de las plantas cultivadas *in vitro* en relación con la forma de cultivo tradicional

Las plantas que fueron propagadas en los SIT mostraron como característica fundamental un incremento en la altura y el número de tallos por metro lineal, así como una disminución en el diámetro de los tallos con respecto a la siembra por estacas tradicionales en las tres variedades estudiadas (Tabla 9).

La disminución del diámetro de los tallos en las plantas procedentes de los SIT ocurre como una consecuencia de la competencia que se crea por el incremento de la densidad de tallos, al aumentar estos en casi un 34 % su cantidad por unidad de área. Este aumento en el número de tallos trajo consigo un incremento en el rendimiento agrícola (ton. de caña/ha) en las plantas propagadas *in vitro* en SIT con respecto a la semilla tradicional, corroborando los resultados descritos anteriormente por Jiménez, (1995) y Lorenzo et al (1998 y 2001).

En el contenido de azúcar expresado en porcentaje pol en caña se observó un incremento en las plantas propagadas en SIT en comparación con las semilla derivada de estacas tradicionales, aunque no todas las variedades tuvieron un comportamiento similar, existiendo una interacción significativa entre el genotipo y el tipo de semilla. Los genotipos CP72 2086 y RB73 2577 presentaron incrementos en el porcentaje de pol en caña en las plantas propagadas en SIT, mientras que el genotipo Mex79 431 no presentó diferencias entre la semilla procedente de propagación tradicional por estacas y las propagadas en SIT.

Con respecto a la producción total de azúcar por hectárea (ton azúcar/ha) no se presentaron diferencias significativas entre los dos tipos de semilla en los genotipos Mex79 431 y RB73 2577, no sucediendo así con la variedad CP72 2086 donde las plantas propagadas en los SIT presentaron diferencias significativas con relación a la semilla tradicional por estacas (Tabla 9).

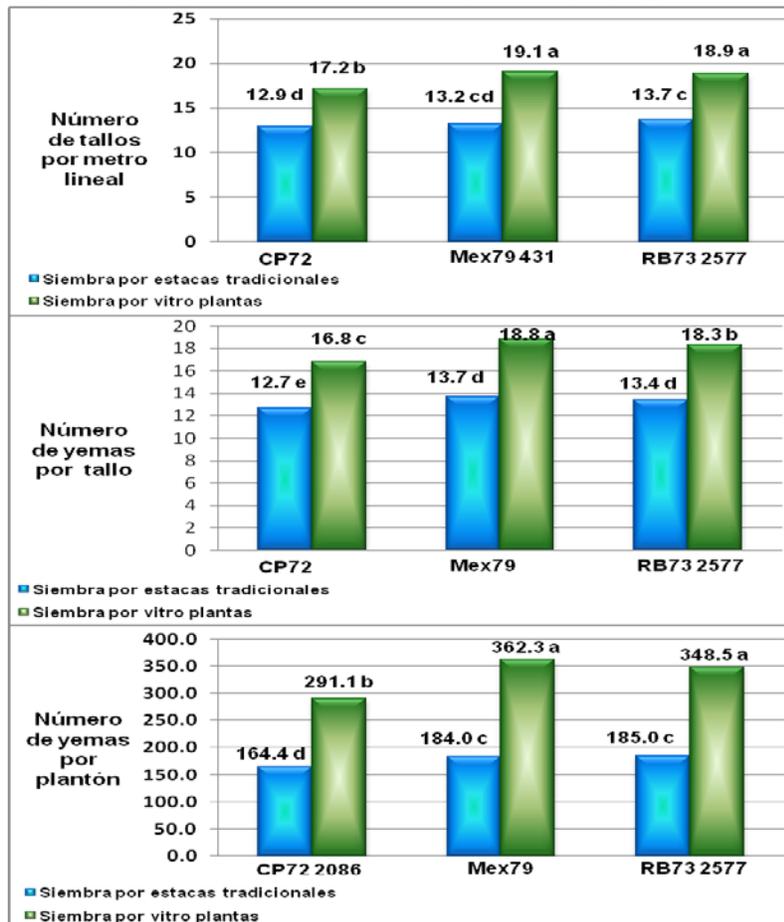
Tabla 9. Estudios en campo de plantas propagadas en los SIT en 3 genotipos de caña de azúcar

Variedad	Tipo de Siembra	Altura de los tallos (cm)	Diámetro de los tallos (mm)	Número de tallos/m	Ton. de caña/ha	% Pol en caña	Ton. de Azúcar/ha
CP72 2086	Estacas (tradicional)	165,25 ± 11,73 e	25,50 ± 0,37 a	12,90 ± 1,21 d	140,47 ± 34,58 ab	16,36 ± 0,69 b	23,91 ± 5,40 b
	Vitro plantas SIT	218,64 ± 16,56 c	24,34 ± 0,29 c	17,21 ± 2,07 b	144,28 ± 32,35 a	16,73 ± 0,68 a	29,30 ± 5,71 a
Mex79 431	Estacas (tradicional)	179,25 ± 14,44 d	25,54 ± 0,23 a	13,26 ± 1,22 cd	125,74 ± 33,39 e	16,22 ± 0,70 b	20,61 ± 4,21 c
	Vitro plantas SIT	244,64 ± 25,59 a	24,41 ± 0,26 b	19,19 ± 1,49 a	128,84 ± 33,50 d	16,27 ± 0,66 b	21,57 ± 4,00 c
RB73 2577	Estacas (tradicional)	175,40 ± 10,55 c	25,55 ± 0,24 a	13,70 ± 1,12 c	133,51 ± 29,25 cd	14,82 ± 1,27 d	21,83 ± 5,02 c
	Vitro plantas SIT	238,47 ± 11,80 b	24,34 ± 0,21 c	18,98 ± 1,68 a	137,28 ± 24,50 bc	15,94 ± 1,36 c	21,13 ± 4,39 c

* Letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Kruskal Wallis

El aumento del vigor de las plantas y el incremento del número de tallos, entre otras características, influyen en el rendimiento agrícola de la semilla procedente del cultivo *in vitro* (Evans, 1986; Peros y Bonnel, 1990; Jiménez 1995; Pérez, 1998; Lorenzo, 1998 y 2001). Ello puede estar asociado a cambios fisiológicos temporales inducidos por el proceso de micropropagación. En la caña de azúcar estas alteraciones observadas en el número de tallos, aumento del vigor y susceptibilidad a enfermedades pueden ser una consecuencia del rejuvenecimiento fisiológico y a la menor incidencia de enfermedades transmitidas por la semilla. (Pérez, 1989; Orellana, 1994).

En este estudio, al comparar la semilla micropropagada con la semilla tradicional en la caña de azúcar (Figura 16), se presentó un incremento en el número de yemas por tallos y el número de yemas por plantón a favor de las plantas propagadas *in vitro* en SIT.



*Rangos medios con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Kruskal Wallis

Figura 16. Evaluación en campo del número de tallos y número de yemas en plantas propagadas en SIT y plantas del sistema tradicional en 3 genotipos de caña de azúcar

Estos resultados confirman las ventajas descritas con anterioridad por Jiménez (1995) para la micropropagación en medios semisólidos y Freire (2001) para las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos.

La capacidad de producir un mayor número de yemas por tallo y un mayor número de yemas por plantón (resultado del incremento en la altura de los tallos y el número de tallos) en las plantas propagadas en SIT, en comparación con la semilla tradicional resulta finalmente en la producción de una mayor cantidad de semilla por área plantada y por tanto un incremento en el coeficiente de multiplicación.

Los incrementos en el número de propágulos - semilla producidos por hectárea en las plantas propagadas en SIT, en comparación con el método tradicional en cada uno de los genotipos estudiados fue de 43 000 tallos/ha para un 33,3 % en la variedad CP72 2086, en la variedad Mex79 431 fue de 59 000 tallos/ha para un 44,6 % y 52 000 tallos/ha en la variedad RB73 2577, lo que representó un aumento del 37,9 %.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- 1- La configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo) indujo un mejor desarrollo morfológico de las plantas y coeficientes de multiplicación que los SIT donde se mantiene la presión de aire (sin intercambio), lo que también se reflejó en una mayor sobrevivencia de las plantas cuando son trasplantadas a la fase de aclimatización.
- 2- En la propagación de la caña de azúcar en SIT el último subcultivo de multiplicación debe realizarse sin adicionar PBZ al medio de cultivo y eliminando la fase de elongación. Con este manejo es posible reducir el tiempo en el esquema de propagación y a la vez incrementar la calidad de las plantas producidas y su posterior sobrevivencia en la fase de aclimatización.
- 3- Con la combinación de la densidad de inóculo de 40 brotes por vaso de cultivo y un tiempo de cultivo de 50 días se logra la mejor utilización de la capacidad del vaso de cultivo, mayor número de plantas por SIT, que en términos productivos significa un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada, permitiendo manejar un mayor número de explantes por área física de las cámaras de cultivo.
- 4- Se realizó el escalado de producción con la combinación de la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo), la eliminación de la fase de elongación y los ajustes en la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo en tres variedades de caña de azúcar, validándose los resultados obtenidos en la presente investigación.
- 5- La introducción de las mejoras en el proceso de propagación masiva en SIT en tres laboratorios comerciales condujo al logro de mejores resultados productivos, demostrándose en la Biofábrica del Ingenio Santa Ana en Guatemala que se incrementó en 2.3 veces la producción total de plantas con la misma capacidad tecnológica instalada.

- 6- Las plantas propagadas *in vitro* en los SIT mostraron un rendimiento agrícola superior al de la siembra por estacas tradicionales en las tres variedades estudiadas, mostrando como característica fundamental un incremento en su capacidad de producir una mayor cantidad de semilla por hectárea plantada y por tanto un incremento en el coeficiente de multiplicación, como resultado del incremento en el número y la altura de los tallos.

Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

1. Validar los resultados obtenidos en esta investigación en otros genotipos de caña de azúcar con la finalidad de poder incorporarlos al proceso productivo, empleando los sistemas de inmersión temporal.
2. Realizar un estudio sobre el efecto económico de la introducción de estas mejoras tecnológicas a escala comercial en la Biofábrica de Caña de Azúcar perteneciente al Ingenio Santa Ana en la República de Guatemala, en la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Cuba) y en la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez”, perteneciente al Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste, Pernambuco, Brasil.
3. Continuar los estudios sobre la influencia de la composición de la atmósfera gaseosa dentro de los vasos de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* en los sistemas de inmersión temporal mediante la medición de la concentración de gases (O₂, CO₂, etileno).

Referencias
Bibliograficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderlini T A. y Kotska. S J. (1986). Initial yield responses of Kleentek tissue culture produced seed cane in Louisiana. Proceeding of the XIX ISSCT Congress
- Adkins S W, Kunanuvatchaidach R, Gray S J y Adkins A L. (1993). Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. J. Exp. Bot. 44, 1829-1835
- Adkins S W, Shiraishi T y McComb J A. (1990). Rice callus physiology: identification of volatile emissions and their effects on culture growth. Physiol. Plant. 78, 526-531
- Agramonte D, Pérez J, Pérez M, Pérez A. (1993). Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCL) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola. 2 pp. 88-89
- Ahlfeld, H. 1996. F. O. Lichts, World Sugar and Sweetener Year Bokk and World Sugar Statistics. F.O. Linchts, Ratzeburg, Germany
- Aitken-Christine J, Kosai T, Takayama S. (1991). Automation in plant tissue culture general introduction and overview. En: Aitken- Christie, J; Kosai T y MA Smith (Eds). Automation and environment control in plant tissue culture. pp 1-8
- Aitken-Christie J, Kozai T y Smith M A L. (1995). Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Akita M y Takayama S. (1994). Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. Plant Cell Rep. 13: 184–187
- Albany, N. (2001). Efectos de retardantes del crecimiento en la micropropagación de bananos en medios de cultivo líquidos en agitador orbital y Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis para optar por el Grado Científico de Master en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas
- Albany N, Vilchez J, Jiménez E, García L, de Feria M, Pérez N, Sarría Z, Pérez B, Clavelo J. (2005). Use of growth retardants 14 for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid Cultutre Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 213-224. Springer, Dordrecht
- Alvard D, Teisson C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissueand Organ Culture. pp. 32: 55- 60
- Anderlini T A y Kotska. S J. (1986). Initial yield responses of Kleentek tissue culture produced seed cane in Louisiana. Proceeding of the XIX ISSCT Congress
- Anónimo. (2000). Guía técnica para el cultivo de “Caña de Azúcar” (2000). (On line). Disponible en la página web: [http:// www.agronegocios.gov.sv/comoproducir/guias/ca%F1aazucar.pdf](http://www.agronegocios.gov.sv/comoproducir/guias/ca%F1aazucar.pdf)

- Aragón C E, Escalona M, Capote I, Pina D, González-Olmedo J. (2005). Plantain (*Musa* AAB) growth in Temporary Immersion Bioreactor (TIB) and *ex vitro* acclimatization. Some aspects of physiology and carbon metabolism. Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005). Ciego de Ávila, 168 *Biotecnología Vegetal* Vol. 7, No. 3
- Aron S P, Monselise R, Goren R, Costo J. (1985). Chemical control of vegetative growth in citrus trees by paclobutrazol. *Hort-Science* 20 (1): 96-98
- Barbón, R. (2003). Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3, No. 4: 211 - 221, octubre - diciembre
- Bausher M. y G Yelenosky. (1987). Morphological changes in citrus associated with relatively high concentrations of Paclobutrazol. *Journal of plant Growth Regulator*. 5: 193-197
- Bernal A, Occeguera Z, Jiménez M, Rivera O, García L, de Feria M. (2002). Use of the Temporary Immersion Systems for sugar cane vitroplants' production. *Biotecnología Vegetal* 2(4): 201-206
- Blazková A, Ullmann J, Josefusova Z, Machackova I y Krekule J. (1989). The influence of gaseous phase on the growth of plants *in vitro*: the effect of different types of stoppers. *Acta Hort.* 251, 209-214
- Borroto C G, Escalona M, Lorenzo J C. (1999). Micropropagation for large-scale agricultural use. Challenge overview and a case study: Temporary immersion biorreactor systems (*Journal of the society for in vitro Biology*). 1999. Vol. 35. Nº 3
- Castro D, González-Olmedo J. (2005). Cultivo mixotrófico de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en Biorreactores de Inmersión Temporal. Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005). Ciego de Ávila
- Castro D, González J. (2002). *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura sostenible* 62 (1): 68-78
- Castro, D. (2001). Propagación mixotrófica de *Eucalipto grandis* Hill ex Maide en biorreactores de inmersión temporal. Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplantitas. Cuba
- Cejas I, Capote I, Escalona M, Noceda C, Rodríguez R, Cañal M J, Roels S, Sandoval J y Deberhg P. (2005). Protocolo para la proliferación de plátano *Musa* AAB (CEMSA ¾) con el empleo de Meta-topolina en Biorreactores de Inmersión Temporal. Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005). Ciego de Ávila
- Chinaea A y J R Pérez. (1997). Secuencia y manejo de la hidrotermoterapia para el control de enfermedades de la caña de azúcar. *ATAC* 1: 31-34
- Chinaea A, H Nass, C Doboin y M D Díaz. (2000). Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamerica, Impreso Imprecolor C.A, Barquisimeto, Venezuela, pp.108

- Cronquist A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. Second Edition. p.57
- Cuellar I A, M E de León, A Gómez, D Piñón, R Villegas, I Santana. (2003). Caña de Azúcar, paradigma de sostenibilidad. Edic. Publica. INICA, La Habana; Cuba, pp.174
- Curtis W. (2005). Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp.21-40
- Daniels D. (1997). Efecto del cultivo *in vitro* en la tuberización de la papa (*Solanum tuberosum* L.), var. Desirée. Trabajo de Diploma. IBP- UCLV. Santa Clara, Cuba
- Daquinta M, Espinosa P, Escalona M, Rodríguez R, Guerra M P. (1999). Bromeliad. Micropropagation in a temporary immersion system. revista Brasileira de Fisiología Vegetal. Brazilian Journal of Plant Physiology. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Fisiología Vegetal. Suplemento, Junho. 11: 177-178
- de Feria M, Jiménez E, Chávez M. (2002). Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var. IBP 89-112. *Biotecnología vegetal Vol. 2, No. 3: 143-147, julio-septiembre*
- de Feria M. (2000). Empleo de biorreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. p.105
- de Feria, M Jiménez, E Chávez M. (1998). Influencia de la densidad de inóculo y la frecuencia de renovación del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) utilizando sistemas de inmersión temporal. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REBIO'98. 1-5 Junio, La Habana, Cuba. Libro de Resúmenes. p.42
- Debergh P and Maene L. (1984). Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. Parasitica. 40, 69 - 75.
- Debergh P, Zimmerman R. (1991). H.(Eds) Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp.31 – 45
- Dixon, RA. (1991). "Isolation and maintenance of callus suspension cultures", en Dixon RA (ed). Plant cell culture a practical approach. IRL PRESS. Washington. 1-20
- Dookun, A. (1998). Biotechnology for sugarcane. AgBiotech New and Information. 10. No. 3. pp.75N-80N
- Early J y G Martin. (1988). Sensitivity of peach seedling vegetative growth to Paclobutrazol. L. Am. Soc. Hort. Sci. 113(1): 23-27
- Etienne H. y Berthouly. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–231

- Escalona M, Cejas I, González-Olmedo J, Capote I, Roels S, Cañal MJ, Rodríguez R, Sandoval J, Debergh P. (2003). The effect of meta-topolin on plantain propagation using a Temporary Immersion Bioreactor. *INFOMUSA*. 12 (2): 28-30
- Escalona M, Lorenzo J C, González B, Daquinta M, Fundora Z, Borroto C G, Espinosa D, Arias E y Aspiolea M E. (1998). New system for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *Pineapple News* 5: 5–7
- Escalona M. (1999). Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplantas. UNICA. pp.20-27
- Evans. D A. (1986). Somaclonal and Gametoclinal variation. Biotechnology for solving agricultural problems. In: Beltsuille symposia in agricultural research. Ed. By Patricia C. Agustin, H.D. Danforth and M.R.Bakst:63-93
- Feldmann, P.; Sapotille, J.; Grédoire, P and P. Roff. (1994). Micropropagation of sugarcane. In: *In vitro* culture of tropical plants. Ed by Claude Teisson. CIRAd. p.15-17
- Flynn L I y T A Anderlini. (1990). Disease incidence and yeal performance of tissue culture-generatetd seed cane over tha crop cycle in Lousiana. *J. Amer.Soc. sugar Cane Tech.* 10 p 113
- Freire M. (20019). “Nueva metodología de embriogenésis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51) empleando medios de cultivo líquidos”. Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Instituto de Biotecnología de las Plantas, p.101
- García E A. (1984). “Manual de campo en caña de azúcar”. Serie Divulgación Técnica IMPA. Libro No. 24. 10-21
- Grossman K, Kwiatkowski J y Jauser C. (1991). Phytorhormonal changes in greening and senescing intact cotyledons of oilseed rape and pumpkin: influence of the growth retardant BAS III. *W. Physiology Plantarum* 83: 544 -550.
- González R M. (2004). Manual de Procedimiento del Servicio de Variedades y Semilla (SERVAS). Minsterio del Azúcar. INICA. Cuba.
- González R, H Jorge, R Almeida, M Manresa S, Tuero L, G Barroso, J González, N Domínguez. (2006). El “SERVAS” y su contribución al mejoramiento de la composición varietal de la caña de azúcar en Cuba. II Simposium Internacional sobre Tranferencias Tecnológicas. TECNOTRANSFER (2006. 19 al 22 de Septiembre) Ciudad Habana del, Casa de la Amistad. Cuba .GEPROP.
- González R, H Jorge, I Jorge, N Bernal, N Sarmiento, R Almeida, S Guillén. (2008). XVI Reunión Nacional de Semilla, Variedades y Sanidad Vegetal. Ministerio del Azúcar-Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. *Revista Cuba y Caña*. Vol 1.
- Heinz D, y Mee G. (1969). “Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species”. *Crop. Sci.* (9): 346-348

- Hernández A, Pérez J M, Bosch D, Rivero L. (1999). Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Edit. AGRINFOR, Ciudad Habana, p.64
- Hernández A, Pérez J M, Marsán R, Morales M y López R. (1996). Correlación de la Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba con las clasificaciones internacionales Soil Taxonomy y FAO-Unesco. Instituto de Suelos, MINAG, p.42p
- Hernández R, González Y, Bernal F, Igarza Y Sarria Z, Pichardo T. y Martínez, Y. (1997). Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido). BIOVEG'97. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. Ciego de Avila, Cuba, del 2 al 5 de abril.p.20
- Heyser J W y Mott R. (1980). The relationship between the production of phenolic compounds and the decline in growth of Loblolly pine cultures. *Plant Physiol.* 65, 90
- Hohe A, Winkelmann T, Schwenkel HG. (1999). CO₂ accumulation in bioreactors suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 18: 863-867
- Jackson M B, Abbott A J, Belcher A R y Hall K C. (1987). Gas exchange in plant tissue cultures. *In: Jackson MB, Mantell S, Blake J, eds. Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures. BPGRF Monograph 16. Bristol: Plant Growth Regulators Group. 57-71*
- Jackson M B, Abbott A J, Belcher A R, Hall K C, Butler R y Cameron J. (1991). Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Ann. Bot.* 67, 229-237
- Jackson W, Wagnespach H, Richard C, Garrison D, Lester W y Amer J. (1990). Cp 65-357 Klentek test in Louisiana, 1985/88. *Soc. Sugarcane Tech.* pp.10-116
- Jankiewicz L. (2003). "Las auxinas sintéticas más importantes", en Jankiewicz L y Urbanczyk E. (eds). *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas.* Editorial Mundi-Prensa México. 427-455
- Jay V, Genestier S, Courduroux J C. (1992). Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. *En: Kozłowski, T T (Ed) Flooding and plant growth* pp.47-128, Academic Press, New York
- Jeong B R, Fujiwara K y Kozai T. (1995). Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Hort. Rev.* 17, 125-172
- Jiménez, E, Pérez N, de Feria M, Barbón R, Capote A, Chavéz M, Quiala E, Pérez J C. (1999). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23
- Jiménez E. (1995). Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba. pp.40-52
- Jiménez E. (1998). "Cultivo de ápices y meristemos", en Pérez JP (ed). *Propagación y mejora genética de las plantas por biotecnología.* Instituto de Biotecnología

de las Plantas. Cuba. Editorial GEO. 45-56

- Jiménez E. (2000). Aclimatización de plantas *In vitro* y producción de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L) en casa de cultivos. Tesis para optar por el grado científico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de Las Villas
- Jiménez E, Pérez J, Gil V, Herrers J, García Y, Alfonso E. (1995). Sistemas para la propagación de caña de azúcar. In: Estrada M, Riego E, Limonta E, Tellez P, Fuentes J (Eds). Avances de la Biotecnología Moderna. *Elfos Scientiae*. Cuba. 3:11.2
- Jiménez E, de Fera, M. (1998). Empleo de biorreactores para la Propagación Masiva. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara
- Jiménez F. (1998). Manejo integrado de vitroplantas en la fase de aclimatización. XI Seminario Científico INCA. Libro de resúmenes, pp.34-35.
- Jorge I, H Jorge, G Pérez, L Cabrera, S Rodríguez, J Vallina y J Mesa. (2002). Influencia del Programa de Fitomejoramiento en la Agricultura Cañera Cubana. XIX Congreso Nacional de Citogenética. Saltillo, México. p.247
- Kozai T. (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. *In Micropropagation –technology and application-*. Eds. P Debergh and R H Zimmerman. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 447-469
- Kozai T, Fujiwara K y Watanabe I. (1986). Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (2) Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. *J. Agr. Met.* 42:119-27
- Kozai T, Kubota C y Nakayama M. (1989). Net photosynthetic rates of plantlets *in vitro* under natural and forced ventilation conditions. Annual Meeting, Jap. Soc. Hort. Sci. pp. 250-251
- Kozai T, Kushihashi S, Kubota C y Fujiwara K. (1991). Effect of the difference between photoperiod and dark period temperatures, and photosynthetic photon flux density on the shoot length and growth of potato plantlets *in vitro*. (in Japanese) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 61, 93-98
- Kubota C y Kozai T. (1992). Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced ventilation. *HortSci.* 27: 1312-1314
- Kvaalen H, von Arnold S. 1991. Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Plant Cell and Organ Culture* 27: 49-57
- L. García-Águila, M León, Kosky R, Orellana P, González R. (2007). Evaluación en campo de la estabilidad genética en plantas obtenidas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA 21' (*Musa* AAAB). *Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 3:143-147, julio-septiembre*

- Leathers R, Smith M, Aitken-Christie, J. (1995). Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. En: Aitken – Christie, J; T. Kozai y M. A. Smith (Eds.). Automation and environment control in plant in tissue culture. pp.178–214
- Levin R, Gava V, Tal B, De Nola, B Vasil, I K. (1988). Automated plant tissue cultura for mass propagation. Biotechnology. 6:1035–1040
- Lorenzo. (1997). Libro resumen del evento BIORREG 97. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. Ciego de Ávila. p.1b
- Lorenzo J, Ojeda E, Espinosa A, Borroto C. (2001). FIELD PERFORMANCE OF TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR-DERIVED SUGARCANE PLANTS. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37:803-806
- Lorenzo J C, Gonzalez B L, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 54:197–200
- Lorenzo J C, González B L, Escalona M, Teisson C, Castillo R, Espinosa P, Sánchez M, Espinosa D, Puentes, C Fundora, Z Iglesias, A Borroto, C Aspiolea, M E Hernández, Z Capote I. (1999). Proliferación de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en Sistemas de Inmersión Temporal. Cuaderno de Fitopatología. 26:76-79
- Lorenzo J C. (2000). Micropropagación de la caña de azúcar en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplasmas. UNICA
- Marrero D, J Martínez, C Gómez, E Rodríguez y R Chamberlain. (1996). Manejo de vitroplantas de caña en la fase IV. XI Fórum de Ciencia y Técnica. IBP. UCLV. Manuscrito
- Marrero D, Montes de Oca, J L, Ravelo D, De León, E Jiménez M, Quintero N, López A, Lorenzo J C, González B L, Escalona M, Espinosa D, Puentes C, Fundora Z, Iglesias A, Borroto C, Aspiolea M E, Cid M. (1998). Sistema de Inmersión Temporal en caña de azúcar. Cambios de Tecnología en Biofábrica. Resumen XIII Jornada Científica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Cuba
- Martín R, Gálvez G, de Armas R, Espinosa R, Vegoa R y Leó A. (1987). “La caña de azúcar en Cuba”. Editorial Científico-Técnica, Habana, Cuba
- Más R, H Pérez, I García, E Pineda, Aday O, M Manresa, Díaz F R. (2007). Tecnología para la Producción de Caña de Azúcar Orgánica (Instructivo Técnico). Premio CITMA
- Medero V R, J López, M García, J Ventura, L Del Sol, M Cabrera, S Rodríguez, M Martínez, M Alvarez, J García. (2000). Multiplicación *in vitro* de la yuca en sistemas de inmersión temporal. XII Seminario Científico del Inca. Libro de Resúmenes. p.162
- Meijer E G M y Brown D C W. (1988). Inhibition of somatic embryogenesis in tissue culture of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, amino-oxyacetic acid, 2,4-

dinitrophenol and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. J. Exp. Bot. 39: 263-270

- Miller A R y Roberts L W. (1984). Ethylene biosynthesis and xylogenesis in *Lactuca* pith explants cultured *in vitro* in the presence of auxin and cytokinin: The effects of ethylene precursors and inhibitors. J. Exp. Bot. 35:691-698
- Molina L A, Rodríguez R, Capote I, Huggins C, Pina D, Escalona M, González-Olmedo J. (2005). Cultivo fotomixotrófico de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005). Ciego de Ávila
- Mordocco A y Brumbley J. (2008). Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). The Society for In vitro Biology. In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. DOI 10.1007/s11627-008-9173-7
- Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15: 473-497
- Okamoto A, Kishine S, Hirose T, Nakazono A. (1996). Effect of oxygen enriched aeration on regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) cell culture. Plant Cell Report 15: 731-736
- Orellana P. (1994). Micropropagación *in vitro* de plátanos y bananos. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- Palhares G, Rodríguez, R Pina, D Y González-Olmedo, J. (2004). Efecto de un análogo de brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en bioreactores de inmersión temporal. Cultivos tropicales, 2004, vol. 25, No. 1, p.39-44
- Paulet F, Acquaviva C, Eksomtrame T y Lu Y. (1992). *In vitro* conservation of a sugarcane collection. En: Proc 1st. Meeting Assoc Franc. Canne Sur, 47-52. Sugarcane, 4: pp. 28.
- Peñate L, Concepción O, Aragón C, Rodríguez R, González-Olmedo J, Escalona M, Cid M, Pina D. (2007). Evaluación del efecto de tres condiciones de cultivo *in vitro* en la calidad de plántulas de caña de azúcar propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 3: 161 - 169, julio-septiembre*
- Perez J. (1989). Die Nutzung der *in vitro* Kultur und die induktion von Mutationen bei der Zucht von Zuckerrohr (*Saccharum* spp.) Leipzig, Univ. Instut fur tropische Landwirtschaft. Disertación para el grado de Doctor B. Alemania
- Pérez G, Prada F y Abrahantes I. (1997). Origen, posición taxonómica y desarrollo del mejoramiento de la caña de azúcar en Cuba. Recursos genéticos de la caña de azúcar. Pérez, G.; Bernal, N.; Chinea, A.; Orelly, J. y Se Prada, F.pp.23-24
- Pérez J y Rodríguez C. (1987). Producción de semillas y propágulos. Editorial Pueblo y Educación. p. 220

- Pérez J, Jiménez E, Agramonte D. (1998). Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp.179-191
- Pérez J, Suárez M, Orellana P. (2000). Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. Biotecnología Vegetal. 1:23 -12
- Pérez N. (2001). Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal para la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) Tesis presentada en opción al Grado Académico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba
- Pérez. (1998). Variación somaclonal. En: J.N. Pérez Ponce (ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Cuba.pp.105-121
- Pérez J, Jiménez E, Agramonte D.(1998). Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp. 179-190
- Pérez J, Orellana P, Gómez R, Jiménez E y Martín D. (1996). Obtención de somaclones mejorados de las variedades de caña (*Saccharum* spp. híbrido) POJ 2878 y C 87-51. En: Resúmenes del tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas.p. 43
- Peros J, Bonnel E. (1990). Utilisations de la culture *in vitro* de la canne a sucre en pathologie: cas de la striure, de la gommose et de la rouville. L'Agronomie Tropicale. pp.44-46
- Piñón D. (2001). Hacia una fitoprotección ecológica de plagas en el SEFIT. En: Curso de actualización en temáticas de sanidad vegetal (SEFIT). Ed. D. Piñón, INICA. Cuba. 1-10
- Posada L, Gómez R, Reyes M, Alvares L. (2003). Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Biotecnología vegetal Vol. 3, No. 1: 3-8, enero-marzo*
- Priel W. (1991). Application of biorreactor in plant propagation. En: Debergh, P. y R. Zimmerman (Eds.). Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publishers.pp.425–455
- Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, Dix P J y Marton L. (1987). Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. Plant Cell Rep. 6, 1-4
- Ramirez D. (2000). Introducción de nuevos frascos en el proceso productivo en las Biofábricas. Tesis presentada en opción al Grado Académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba
- Riera L. (2004). Variedades cubanas ocupan el 87% del área cañera nacional.

- Roca W M y Mroginsky L A. (1993). "Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales", en Roca WM y Mroginsky LA (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. Publicación CIAT No. 151:1-18
- Rodríguez W. (2000). Botánica, domesticación y fisiología del cultivo del ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Mesoamericana. Vol. 11 (2): 133-152
- Rodríguez R, Cid M, Pina D, González J L, Desjardins Y. (2003). Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultured in temporary immersion bioreactors. *In vitro Cellular and Development Biology Plant* 39(6): 657-662
- Rosales U. (2003). Una nueva etapa en el sector azucarero. Cuba, Foreign Trade 1/2003. pp 4 – 7
- Roustan J P, Latche A y Fallot J. (1989). Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.* 8, 182-185
- Salgado G S, Bucio A L, Riestra D D y Lagunas E C, (2003). "Caña de azúcar: hacia un manejo sustentable. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados-Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. p.23-27
- Sandoval J, Pérez L, Côte F. (1997). Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa AAA* cv. 'Gran Enano'). Etapas de cultivo *in vitro*, aclimatización y campo. *CORBANA* 22(48): 41-60
- Santana I A, (1997). "Estudio de la variabilidad en poblaciones de caña de azúcar por cultivo de tejidos". Tesis para optar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas
- Shigeta J, Sato K, Mii M. (1996). Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science* 115: 109-114
- Shimazu T, Kurata K. (1999). Relationship between production of carrot somatic embryos and dissolved oxygen concentration in liquid culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 29-38
- Slater A, Scott W N y Fowler R M. (2004). "Plant cell tissue culture", en: *Plant biotechnology. The genetic manipulation of plantas*. ISBN 0-19-925468-0. Oxford University press. pp.368
- Smith M, Hamill S. (1993). Banana tissue culture. Banana industry protection board of Strategic Plan 1994-99/Annual report 1993-1994. pp.27-29. Queensland. Australia
- Soil Survey Staff. 1999. Soil Taxonomy. USDA. Second Edition. p.890
- Spaargaren O C, Arnold R W, Blume H M, Bridges EM. (1994). World Reference Base for Soil Resources. FAO, ISRIC, ISSS., Wageningen/Rome, p.161
- Teisson C, Alvard D, Berthouly M, Cote F, Escalant J V, Etienne H, Lartand M.

(1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by Temporary Immersion. CIRAD / BIOTROP. P. O. Box. Acta Hort. 410: 521–526

- Teisson C, E Alvard, D Francois, X Cote, M Berthouly, M Lartaud. (1994). *In vitro* culture by temporary immersion. *In vitro* culture of tropical plants. (CIRAD). pp. 7-11
- Teisson C, E Alvard, D. (1995). A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: Temporary immersion. M. Terzi et al. (eds), Current issues in Plant Molecular and cellular Biology, Kluwer. Acad. Pub. pp.105-110
- Tisserat B, Vandercook C E. (1985). Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 5: 107-117
- Ventura J, Medero V, López J, García M, Rodríguez S, García G, Reynaldo D. (1998). Manejo de los explantes en Inmersión Temporal, clon de Banano FHIA-18. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacios de Convenciones de La Habana. FAO. Cuba. pp. 64
- Wang P, Heineimann P, Walker P, Heuser C. (1999). Automatec micropropagated sugarcane shoots separation separation by machine vision. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers.* 42(1):247–254
- Werbrouck S P, Deberg P C. (1996). Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin – induced adventitious shoot proliferation in Araceae. *J. Plant Growth Regl.* 15. pp.81–85
- Yeung E, Rahman H y Thorpe T. (1996). Comparative Development of zygotic and microspore-derived embryos in Brassica napus L. cv Topas. I. Histodifferentiation Int. *J. Plant Sci.* 157(1).pp. 27-39
- Ziv M. (1989). Enhanced shoot and cormllet proliferation in liquid cultured *Gladiolus* buds by growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17:101-110
- Ziv M y Hadar A. (1991). Morphogenic patterns of plants micropropagated in shaken flasks or large scale bioreactor cultures. *Israeli Journal of Botany* 40: 145-153
- Ziv M, Ronen G, Raviv M. (1998). Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34:152-158
- Ziv M. (1995). *In vitro* acclimatisation. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M.A.L., eds. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 301-319
- Zobayed S M A, Afreen F y Kozai T. (2001). Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37, 807-813
- Zobayed S M A, Kubota C y Kozai T. (1999). Development of a forced ventilation micropropagation system for large-scale photoautotrophic culture and its utilization in sweetpotato. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35, 350-355

- Zobayed S M A. (2005). Ventilation in micropropagation. En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed. pp. 143-182. Springer