



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Trabajo Final de Graduación
Modalidad: Tesina

**EFECTO DE LA EDAD DE LAS PLANTAS *in vitro*
Y DE UN ACTIVADOR DEL CRECIMIENTO
RADICAL SOBRE LA ACLIMATIZACIÓN DE
DIFERENTES CULTIVARES DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta*)**

Alumna: Johana Vanesa GALEANO

Asesor: Dr. Ricardo Daniel MEDINA

Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE

2016

Lugar de realización: Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste.

Agradecimientos:

- A mi asesor de Tesina Ing. Agr. (Dr.) Ricardo Daniel Medina por su atención, disposición e instrucción de lo planificado.
- Al Ing. Agr. Luis Amado Mroginski por permitirme realizar los trabajos de laboratorio en la Cátedra de Fisiología Vegetal.
- A la Facultad de Ciencias Agrarias – UNNE, por darme la posibilidad de realizar y culminar mi carrera universitaria.
- A mi querida Familia y a mis compañeros por apoyarme y por ser mi gran sostén.

Índice

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Resumen</i> | 1 |
| <i>Título</i> | 3 |
| <i>Antecedentes</i> | 3 |
| Hipótesis de trabajo | 5 |
| Objetivo general | 5 |
| <i>Materiales y Métodos</i> | 5 |
| Material vegetal | 5 |
| Aclimatización de las plantas regeneradas <i>in vitro</i> a condiciones <i>ex vitro</i> | 5 |
| Diseño experimental y análisis estadísticos | 9 |
| <i>Resultados</i> | 10 |
| <i>Discusión</i> | 28 |
| <i>Conclusión</i> | 34 |
| <i>Bibliografía</i> | 34 |

Resumen

La etapa final de la micropropagación comprende la transferencia de vitroplantas a condiciones *ex vitro* y se conoce como aclimatización. En general, se recomienda que este proceso sea progresivo, a fin de minimizar las condiciones de estrés que puedan dañar al vegetal e incluso causar su muerte. Por ello, se hace necesario estudiar distintos factores intrínsecos y extrínsecos que afectan la aclimatización para poder desarrollar técnicas de manejo que permitan superar esta etapa, que brinden plantas de óptima calidad para ser llevadas al campo y que sean efectivas para distintos genotipos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de distintas concentraciones de un activador del crecimiento radical (Inicium®, Bioibérica S.A.) y de la edad de las plantas *in vitro* sobre la etapa de aclimatización *ex vitro* de diferentes cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*). Para ello, en un primer experimento se aclimatizaron plantas *in vitro* de los cultivares: Palomita, Blanca de Santa Catarina y Rocha en sustrato comercial Sunshine Mix#6 (Florensa), las que fueron tratadas con distintas dosis de Inicium® (22,7 y 45,5 ml totales de una solución de 0,6 % v/v) y un control regado con agua destilada. Este bioestimulante es un fertilizante compuesto por péptidos caracterizados de bajo peso molecular al 40% p/p, N total al 5,5% p/p y P (P_2O_5) al 5,5 % p/p. En un segundo experimento, se evaluó el efecto de la edad de las plantas *in vitro* sobre la efectividad de la aclimatización *ex vitro*. Se evaluaron plantas regeneradas *in vitro* de diferentes edades (30, 45 y 60 días de cultivo), las que fueron transplantadas en macetas con sustrato comercial (Sunshine Mix#6, Florensa), regadas con 22,7 ml totales de una solución de 0,6% v/v de Inicium®. La incubación se llevó a cabo en cámara de luz (14 hs de fotoperíodo, irradiancia PAR de $116 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 21 días y a la intemperie por 7 días (28 días totales). El diseño experimental fue del tipo factorial 3x3 completamente aleatorizado, con 3 repeticiones de 6 plantas cada una, alcanzando un n=18 para cada tratamiento (3 genotipos vs. 3 dosis del bioestimulante en el Experimento 1, y 3 genotipos vs. 3 edades de plantas en el Experimento 2).

La supervivencia de plantas de mandioca evaluadas a los 7, 14, 21 y 28 días de aclimatización no evidenció diferencias significativas en relación a las dosis probadas de Inicium®, ni a las diferentes edades de las plantas a aclimatar, independientemente del genotipo. Los valores de supervivencia fueron altos (89-100%), incluso en plantas transferidas a las condiciones externas.

A los 28 días de aclimatización se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre el número de hojas secas. En la altura de plantas, el número de nudos y hojas totales no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El contenido relativo de clorofila medido con SPAD manifestó diferencias estadísticas en relación al genotipo y a la aplicación del bioestimulante. A los 21 días, se notó el efecto positivo de la aplicación de Inicium® sobre el contenido relativo de clorofila en los tres genotipos, lo cual a los 28 días se mantuvo en los cvs. Rocha y Bl. Sta. Catarina, siendo mejor la menor dosis. A los 28 días también se observó interacción significativa entre el genotipo y la aplicación de Inicium®, para el PF y el PS de tallo y raíces y en el PS de hojas, los que se vieron favorecidos con la aplicación de Inicium® en el cv. Rocha. En el cv. Bl. Sta. Catarina se registraron valores altos de PF y el PS de tallo y raíces y en el PS de hojas respecto del cv. Palomita, aunque no se evidenció diferencias significativas cuando se compararon las aplicaciones de Inicium® vs. los respectivos testigos. El genotipo generó diferencias significativas para el PF de hojas y el área foliar, siendo el cv. Bl. Sta. Catarina el que manifestó el mayor PF de hojas y el mayor área foliar y el cv. Palomita los valores más bajos. En el PF de hojas se evidenciaron diferencias significativas debidas al genotipo y a las diferentes dosis de Inicium®, siendo la menor dosis la que generó mayor peso.

La edad de las plantas *in vitro* no afectó la supervivencia de las plantas aclimatizadas *ex vitro*, aunque causó diferencias significativas en algunos parámetros morfométricos. En relación al genotipo, el análisis estadístico de la altura de plantas, número de nudos, hojas secas y hojas totales por planta reveló diferencias significativas. También se registraron diferencias con respecto a las edades de las plantas *in vitro* en el número de nudos y hojas secas. Las plantas de 45 días presentaron un mayor número de nudos que las de 30 días y el número de hojas secas fue mayor aclimatizando plantas de 45 y 60 días de edad en los 3 cultivares. Con respecto al contenido relativo de clorofila a los 28 días, sólo se observaron diferencias estadísticas debidas al genotipo, siendo el cv. Rocha el que manifestó los valores más bajos. En el PF y PS de tallo, hojas y raíces se observaron diferencias significativas debidas al genotipo. El cv. Palomita presentó los menores PF y PS de tallo. En el cv. Bl. Sta. Catarina se obtuvieron los mayores valores de PF y PS de hojas y raíces y de área foliar. Se observaron diferencias estadísticas relacionadas a la edad de las plantas *in vitro* sólo en el PF de tallo de las plantas aclimatizadas, obteniéndose los

mayores pesos con plantas de 45 y 60 días de edad.

A los 28 días de aclimatización, la altura de plantas, número de nudos, hojas secas y hojas totales por planta, PF y PS de tallo y hojas, y el área foliar fueron mayores al final de la aclimatización respecto de su condición inicial como planta regenerada *in vitro* en todos los cultivares. En plantas del cv. Rocha aclimatizadas se observaron las plantas más altas y en el cv. Palomita el menor número de nudos. En el número de hojas secas además de presentarse diferencias entre las plantas *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro* se manifestaron diferencias debidas al genotipo. El contenido relativo de clorofila no evidenció diferencias significativas cuando se compararon plantas *in vitro* sin aclimatizar con plantas aclimatizadas *ex vitro*, independientemente del genotipo. En el caso del PF y PS de raíces se observaron diferencias entre plantas *in vitro* y las aclimatizadas *ex vitro* en los cvs. Rocha y Bl. Sta. Catarina. Independientemente del genotipo, cuando se compararon las plantas aclimatizadas *ex vitro* derivadas de plantas de 45 días *vs.* las plantas *in vitro* recién removidas del tubo se observó que la altura de plantas, número de nudos y hojas secas, contenido relativo de clorofila, PF y PS de tallo y hojas y el área foliar fueron mayores al final del proceso. En los cvs. Rocha y Bl. Sta. Catarina se observaron diferencias en el PF y PS de raíces entre plantas *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro*. Los resultados sugieren que la edad ideal de planta *in vitro* de mandioca para someter a la aclimatización sería la de 45 días, dado que brinda un mayor tasa de multiplicación y mayor peso de tallo respecto de las plantas de 30 días, acortando el tiempo de obtención de plantas útiles para el campo en comparación con las plantas de 60 días.

De acuerdo a estos resultados, el producto Inicium® a pesar de comercializarse principalmente como un bioestimulante activador del crecimiento radical, tuvo un gran impacto sobre parámetros de crecimiento aéreo (contenido relativo de clorofila y PF de hojas), manifestándose una influencia genotípica destacada. También la interacción entre el genotipo y la aplicación del bioestimulante demostró diferencias significativas en algunos parámetros de peso en el cv. Rocha, en favor del tratamiento con Inicium®. La edad óptima de las plantas *in vitro* para someter a la aclimatización sería la de 45 días, independientemente del genotipo. El estudio de los factores que influyen sobre la efectividad de la aclimatización de plantas *in vitro* de mandioca permitirá la optimización de la micropropagación, garantizando plantines vigorosos y rústicos en corto tiempo.

Título: EFECTO DE LA EDAD DE LAS PLANTAS *IN VITRO* Y DE UN ACTIVADOR DEL CRECIMIENTO RADICAL SOBRE LA ACLIMATIZACIÓN DE DIFERENTES CULTIVARES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*).

Antecedentes:

La mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae), es un arbusto perenne originario del continente americano, al igual que las 97 especies restantes del género *Manihot* (Rogers y Appan, 1973). La mandioca, en particular, es nativa de América del Sur (Olsen y Schaal, 2001). Como cultivo se ha desarrollado inicialmente en una amplia área de tierras bajas y calientes de los trópicos americanos que van del noreste de Brasil hasta el noroeste de América del Sur (Venezuela y Colombia) (Montaldo *et al.*, 1979). Los indígenas fueron los que la utilizaron antes de la conquista y luego de la llegada de Colón a América en 1492 se extendió hacia otros continentes. En gran parte de América del Sur es denominada mandioca, pero en Centroamérica se la conoce como yuca, en inglés es conocida como cassava y en francés como manioc (Montaldo *et al.*, 1979)

Actualmente el cultivo de mandioca se ha extendido a unos 90 países tropicales y subtropicales (FAO-FIDA, 2000), en latitudes menores de 30° y que van desde el nivel del mar hasta los 1800 msnm (Dufour, 1996; Ceballos, 2002).

Según datos de la FAO, la producción mundial de mandioca fue de 256,5 millones de toneladas en una superficie cultivada de 19,9 millones de ha (FAOSTAT, 2012); siendo África el continente con mayor producción mundial (54%); Nigeria el principal productor del mundo con cosechas de 44 millones de toneladas. Asia produce el 29,6% de la mandioca a nivel mundial logrando los máximos rendimientos, destacándose Tailandia con 22,6 millones de toneladas, seguida de Indonesia con 19,9 millones. En América del Sur, el principal productor es Brasil con 26,7 millones de toneladas, seguido por Paraguay, Colombia y Argentina. En nuestro país, la producción de mandioca es de 180 mil toneladas en una superficie de 80 mil ha; generalmente las plantaciones se realizan en pequeñas parcelas, estimándose que en la provincia de Misiones la superficie plantada con mandioca ronda las 40.000 ha, en Formosa 20.000 ha, Corrientes 18.000 ha y en Chaco, unas 2.000 ha (De Bernardi, 2011).

La mandioca posee raíces tuberosas que almacenan altos contenidos de carbohidratos, esto la convierte en un importante alimento energético para la dieta de personas (cocida) y animales (cruda, cocida o deshidratada) (Cock, 1989).

En algunos países las hojas se consumen como verdura fresca, siendo más nutritivas que las raíces dado su alto contenido proteico, de minerales y vitaminas, (Henry *et al.*, 1998; León, 2000). Las raíces también pueden ser utilizadas por la industria (Ceballos, 2002), por ejemplo en la industria alimenticia (fécula, harinas, helados, chocolate, productos instantáneos), petrolera o minera (como lubricante), farmacéutica (talcos, excipientes), cosmética, textil (alfombras), de pegamentos, tintas, papel (cartulinas, cheques) y de los biocombustibles (PRODECA, 2005).

La planta de mandioca puede alcanzar 1 a 3 m de altura; a veces no ramifica y si lo hace ramifica simpodialmente produciendo hasta cuatro ramas primarias; el tallo puede tener posición erecta, decumbente o postrada, y el grosor puede ser de 2 a más de 4 cm.

Las hojas son simples, alternas, palmatisectas con 3-9 lóbulos ovados o lineares con una longitud de 15 cm aproximadamente.

La planta, si proviene de una semilla, desarrolla una raíz primaria pivotante y varias de segundo orden, y si se regenera de estacas caulinares sus raíces son adventicias, formándose a partir de la base inferior cicatrizada de la estaca y de los brotes nuevos. Las raíces inicialmente son fibrosas, tiempo después algunas de ellas se expanden radialmente debido al crecimiento secundario formando las raíces denominadas tuberosas (León, 2000). Esta es una característica

muy importante, porque estos órganos (las raíces tuberosas) constituyen su principal producto de cosecha.

La mandioca es una especie monoica, que produce racimos de racimos con flores masculinas en la parte superior del racimo y las flores femeninas en la posición basal del mismo. La ocurrencia del fenómeno conocido como protoginia desfavorece la autopolinización (Ceballos, 2002); como consecuencia la reproducción sexual de la mandioca frecuentemente se produce mediante polinización cruzada, realizada típicamente por la acción de insectos, por lo que la progenie será sumamente heterogénea (Domínguez *et al.*, 1983; Alves, 2002).

Para conservar las características genéticas favorables de la planta madre, el cultivo de mandioca es tradicionalmente propagado en forma agámica, mediante estacas caulinares (Cock, 1989; López, 2002; El-Sharkawy, 2003). Si bien este tipo de propagación es sencilla y económica, presenta serios problemas, tales como la baja tasa de multiplicación (una planta produce entre 10 a 20 estacas por año aproximadamente), las dificultades de conservación de las ramas estaqueras y la diseminación de plagas y enfermedades. A su vez, estos inconvenientes se ven amplificados por la falta de sistemas organizados que permitan abastecer a los productores con “estacas-semilla” (López, 2002; Escobar *et al.*, 2006).

Por estos motivos, se ha desarrollado métodos más eficientes y rápidos de regeneración de plantas de mandioca mediante el cultivo *in vitro* de tejidos, ya sea por embriogénesis somática (Mroginski y Scocchi, 1993; Raemakers *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 2003) u organogénesis (Smith *et al.*, 1986; Mussio *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998).

El cultivo de tejido *in vitro* es una técnica biotecnológica utilizada para la micropropagación vegetal que consiste en aislar un explante, cultivarlo asepticamente en un medio de composición química definida y luego incubar en condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991).

Con este método, a partir de un pequeño segmento caulinar inicial de tejido es posible propagar masivamente, en corto tiempo, en una pequeña superficie y en cualquier época del año, plantas genéticamente idénticas a la planta madre y con calidad sanitaria garantizada (García Garibay *et al.*, 1993).

Las plántulas obtenidas bajo condiciones artificiales (luz, humedad, temperatura, alimentación) salen al ambiente natural muy débiles y con dificultades para adaptarse a condiciones autotróficas, por lo que necesita un proceso de aclimatización antes de ser llevadas al sitio definitivo (Pila y Benítez, 2007).

La etapa de aclimatización o también llamada endurecimiento es realizada bajo condiciones controladas, y permite que las plantas producidas *in vitro* se adapten gradualmente a nuevas condiciones edafoclimáticas naturales donde serán transferidas para el desarrollo del cultivo.

La etapa de aclimatización es muy delicada, en esta fase es alto el porcentaje de pérdida de plántulas, constituyendo un cuello de botella (Segovia *et al.*, 2002). El paso de las plantas de las condiciones *in vitro* a las condiciones *ex vitro* debe realizarse progresivamente, a fin de minimizar las condiciones de estrés que pueden producir daños profundos e incluso la muerte de las plantas (Da Silva *et al.*, 1995). Se sabe que en las nuevas condiciones de crecimiento, las plantas experimentan una humedad relativa muy inferior y una intensidad lumínica comparativamente muy superior (Pospíšilová *et al.*, 1999; Jorge *et al.*, 2000), pasa de un medio rico en nutrientes a un sustrato más empobrecido (Segovia *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2007) y la exposición al ataque patógenos (Grattapaglia y Machado, 1990), por lo que debería garantizarse las condiciones más propicias para un crecimiento inicial más vigoroso.

Un factor intrínseco que podría interferir en la supervivencia *ex vitro* durante la aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro* es la edad de las mismas al momento de transferirlas al ambiente exterior. Se ha demostrado que plantas de *Stemona curtisii* Hook.f. producidas *in vitro* al ser transferidas al suelo con 1, 2 y 3 meses de edad mostraron diferencias en la supervivencia durante el proceso de aclimatización *ex vitro*. Se ha demostrado que la edad

óptima de las plantas *in vitro* de *Stemona curtisii* para su aclimatización fue de 60 días (Palee *et al.*, 2012).

Por otra parte, actualmente se han desarrollado productos comerciales a base de péptidos de bajo peso molecular que permiten superar el estrés que sufren las plántulas al momento del transplante en diversas especies hortícolas, frutícolas y forestales (Botta *et al.*, 2009; Cañete *et al.*, 2012). En particular, el producto Inicum ® se ha citado como un activador del desarrollo de las raíces de plántulas en las etapas iniciales de su crecimiento, asegurando su establecimiento cuando son transferidas a un nuevo entorno productivo (Botta *et al.*, 2009).

Determinar la edad óptima de las plantas de mandioca para transferirse a condiciones naturales y probar la efectividad de la aplicación de activadores de la actividad radical podría mejorar la supervivencia y el crecimiento *ex vitro* de las mismas.

Hipótesis de trabajo: La aplicación de un activador del crecimiento radical y la edad de las plantas *in vitro* afectan la supervivencia y el crecimiento *ex vitro* de plantas de diferentes cultivares de mandioca.

Objetivo: Evaluar el efecto de distintas concentraciones de un activador del crecimiento radical (Inicum ®, Bioibérica S.A.) y la edad de las plantas *in vitro* sobre la etapa de aclimatización *ex vitro* de diferentes cultivares de mandioca.

Materiales y Métodos:

Material vegetal

Se trabajó con plantas de mandioca (*Manihot esculenta*) regeneradas *in vitro*, pertenecientes al banco de germoplasma activo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Botánica del Nordeste - CONICET y de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Se ensayó con los siguientes 3 cultivares: Palomita, Blanca de Santa Catarina y Rocha, las cuales corresponden a cultivares de interés para la agricultura del NEA. Las plantas de los cultivares que se utilizó en los ensayos se propagó *in vitro* (Fig. 1a) en el medio de micropropagación compuesto por el medio basal de Murashige y Skoog (1962) más 0,01 mg/L de 1-ácido naftalenacético, 0,01 mg/L de 6-bencilaminopurina y 0,1 mg/L de ácido giberélico (Cavallero *et al.*, 2012), permitiendo asegurar la cantidad de material vegetal para la realización del plan propuesto. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con soluciones de KOH y/o HCl y se solidificó con 0,75% de agar (Agar Sigma ® A1296). Se dispensaron 15 ml de medio de cultivo en tubos de ensayo de 50 ml que fueron obturados con papel de aluminio y esterilizados en autoclave a 1 atmósfera de presión (120°C) durante 20 minutos. En flujo laminar de aire estéril se cultivó un segmento uninodal por tubo, el cual se obturó con Resinite AF 50 ® (Casco S.A.C.I.F., Bs. As.).

Aclimatización de las plantas regeneradas *in vitro* a condiciones *ex vitro*

Experimento 1:

En el primer ensayo las plantas multiplicadas *in vitro*, con 60 días de edad fueron desprovistas de medio de cultivo y sumergidas durante 10 min en una solución de fungicida preventivo dicarboximida de la marca Captan® al 2% (Fig. 1 b) y para luego ser transferidas y permanecer en condiciones *ex vitro* en macetas de 340 cm³ contenido 36 gramos de sustrato comercial (Sunshine Mix#6, Florensa) (Fig. 1 c), cuya composición se informa en Tabla 1. Las plantas trasplantadas fueron cubiertas por una bolsa plástica y pulverizada con agua para aumentar y mantener la humedad ambiente circundante (Fig. 1 d), las cuales fueron retiradas a

las 2 semanas de su transferencia. La incubación se llevó a cabo en cámara de luz (14hs de fotoperíodo y $116 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiancia, con una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 21 días (Fig. 1 e y f) y luego fueron llevadas a la intemperie por 7 días (Fig. 1 g). Se detallan las condiciones ambientales en la que se llevaron a cabo los experimentos en cámara de cultivo durante 21 días (Tabla 2) y a la intemperie durante 7 días (Tabla 3 y 4). Los datos de temperatura, humedad relativa ambiente, velocidad media del viento y precipitación de las condiciones ambientales externas fueron registrados con una Estación meteorológica Pegasus y la radiación fotosintéticamente activa (PAR) fue cuantificada con un ceptómetro “CAVARRAD” a las 8, 12 y 16 horas de los 7 días del ensayo.

Tabla 1: Composición del sustrato comercial (Sunshine Mix#6, Florensa) que fue utilizado para la aclimatisación de plantas *in vitro* de mandioca.

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Componentes | Turba de musgo <i>Sphagnum</i> 100% |
| | Agente humectante |
| | Macro y micro elementos |
| Características Físicas | Capacidad de aire: 10 – 20% |
| | Capacidad de humectación: 50 – 70% |
| | Densidad en seco: 0,11 – 0,15 Kg/dm ³ |
| | Densidad en húmedo: 0,8 – 0,96 Kg/dm ³ |
| Características Químicas | pH = 5,5 – 6,5 |
| | Conductividad: 1 – 4 mmhos/cm |
| | Concentración de nutrientes en ppm: NO ₃ ⁻ 90 ; NH ₄ ⁺ 35 ; P 90 ; K 287,5 ; Ca 262,5 ; Mg 130 ; S 325 ; Mn 0,4 ; Cu 0,45 ; B 0,85 ; Zn 1,15 ; Fe 0,25 ; Mo 0,25. |

Tabla 2: Condiciones ambientales de la cámara de cultivo.

| Condiciones ambientales de la cámara de cultivo | |
|-------------------------------------------------|------------|
| Temperatura (°C) | 27°C + 2°C |
| Radiación PAR media (umol*m-2*s-1) | 116 |

Tabla 3: Condiciones ambientales externas para el Experimento 1 realizado entre el 28/02/2013 y el 07/03/2013.

| Condiciones ambientales externas (intemperie) | |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| Temp. Media Máx (°C) | 26,2±4,5 |
| Temp. Media Mín (°C) | 11,3±3,4 |
| Temp. Media (°C) | 18,8±3,01 |
| Humedad Relativa Máx (%) | 91,5±4,6 |
| Humedad Relativa Mín (%) | 47,0±12,8 |
| Humedad Relativa Media (%) | 69,2±8,1 |
| Velocidad Media del viento (Km/h) | 3,9±2,1 |
| Precipitación (mm) | 20,25 |
| Radición PAR Media ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) 8 h | 82,5±13,1 |
| Radición PAR Media ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) 12 h | 513±109,6 |
| Radición PAR Media ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) 16 h | 123,0±15,6 |

Tabla 4: Condiciones ambientales externas para el Experimento 2 realizado entre el 19/09/2013 y el 26/09/2013.

| Condiciones ambientales externas (intemperie) | |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| Temp. Media Máx (°C) | 31,84±2,57 |
| Temp. Media Mín (°C) | 17,54±1,67 |
| Temp. Media (°C) | 24,69±1,66 |
| Humedad Relativa Máx (%) | 95,38±1,40 |
| Humedad Relativa Mín (%) | 48,87±14,18 |
| Humedad Relativa Media (%) | 72,13±6,98 |
| Velocidad Media del viento (Km/h) | 3,57±1,15 |
| Precipitación (mm) | 3,05 |
| Radición PAR Media ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 8 h | 25,14±9,97 |
| Radición PAR Media ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 12 h | 364,0±116,9 |
| Radición PAR Media ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 16 h | 68,59±10,1 |

Al inicio de la aclimatización, se ensayaron distintas dosis de Inicium ® (22,7 y 45,5 ml totales para 36 gramos de sustrato por maceta de 340 cm³) partiendo de una solución de 0,6% v/v, aplicadas en forma líquida, repartidas en 2 o 3 veces, la primera realizada al momento de la transferencia *ex vitro* y las restantes practicadas semanas posteriores (Tabla 5), mientras las plantas permanecían en cámara climatizada. El control siempre fue regado con agua destilada. Inicium ® es un bioestimulante fertilizante órgano-mineral Nitrógeno-Fósforo de la empresa Bioibérica S.A.; está compuesto por péptidos de bajo peso molecular al 40% p/p, N total al 5,5% p/p y P (P₂O₅) al 5,5 % p/p.

En la etapa de aclimatización realizada en las condiciones ambientales externas, se aplicó riego por aspersión 2 veces al día y se agregó agua al sustrato cada 2 o 3 días.

Figura 1: Aclimatación de plantas de mandioca regeneradas *in vitro* a condiciones *ex vitro*.



Referencias: a: plantas regeneradas *in vitro*; b: tratamiento sanitario aplicado a las plantas previo a su transplante; c: transferencia *ex vitro* a sustrato comercial; (a, b y c, barras = 1 cm); d: acondicionamiento de las plantas transplantadas con bolsas plásticas a modo de cámara húmeda; e: aclimatización en cámara de cultivo; f: plantas aclimatizadas en cámara de cultivo listas para su transferencia a la intemperie; g: aclimatización en condiciones ambientales externas luego de 28 días de su transferencia *ex vitro*; (d, e, f y g, barras = 10 cm).

Tabla 5: Tratamientos realizados en el Experimento 1.

| Tratamientos | Transplante | Semana 2 | Semana 3 | Volumen Total |
|--------------|----------------|----------------|------------------|---------------|
| T1 (testigo) | Agua | Agua | Agua | 0 ml |
| T2 | 15 ml solución | Agua | 7,7 ml solución | 22,7 ml |
| T3 | 15 ml solución | 15 ml solución | 15,5 ml solución | 45,5 ml |

Referencias: Cada tratamiento aporta una determinada cantidad de Nitrógeno (N) y Fósforo (P_2O_5).

T1: agua = 0 mg de N total; 0 mg de P_2O_5 .

T2: 22,7 ml solución (0,6% v/v) = 0,136 ml de Inicum = 7,5 mg de N total;
7,5 mg de P_2O_5 .

T3: 45,5 ml solución (0,6% v/v) = 0,273 ml de Inicum = 15 mg de N total;
15 mg de P_2O_5 .

Experimento 2:

En el segundo ensayo se evaluó el efecto de la edad de las plantas *in vitro* sobre la efectividad de la aclimatación *ex vitro*. Para ello se utilizaron plantas diferentes edades: 30, 45 y 60 días. Todas las plantas se transplantaron según el procedimiento descripto en el Experimento 1, y fueron tratadas con 22,7 ml de solución Inicum ® de acuerdo a los valores informados en la Tabla 5 (T2 del Experimento 1). Este ensayo se realizó para determinar si es posible establecer la edad óptima de la planta para transferirse *ex vitro* y de esa manera acelerar el proceso de obtención de plantas de mandioca aclimatizadas.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño de los experimentos fue completamente aleatorizado, con 3 repeticiones de 6 plantas cada una, alcanzando un $n=18$ para cada tratamiento (factorial 3 x 3: genotipo vs tratamiento con bioestimulante en el Experimento 1, y genotipo vs edades en el Experimento 2).

Al comienzo de cada ensayo se tomó una muestra de plantas *in vitro* y se determinó los valores iniciales de cada una de las variables que luego se midió en las plantas aclimatizadas *ex vitro*.

Durante la realización de cada Experimento se registraron semanalmente los datos de supervivencia, altura de planta, número de nudos por planta, número de hojas secas por planta, número de hojas totales por planta y se estimó el contenido relativo de clorofila utilizando un medidor portátil SPAD-502 Minolta (Soil Plant Analysis Development). La lectura con el detector de clorofila SPAD-502 se realizó en el lóbulo central de 3 hojas totalmente expandidas por planta desde la tercera por debajo del ápice, evitando colocar el lector sobre la nervadura central, considerándose como valor definitivo el promedio de las 3 determinaciones.

Los valores de SPAD se basan en el principio que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que es reflejada entre en contacto con la celda detectora del SPAD 502 y es convertida en una señal eléctrica. La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad de luz utilizada por la clorofila, la señal es procesada, y la absorbancia es cuantificada en valores dimensionales que van de 0 a 199, por lo que las unidades de SPAD serán siempre las mismas de acuerdo al tono verde de las hojas (Krugh *et al.*, 1994). Las unidades de SPAD correlacionan significativamente con los valores de nitrógeno total determinados con la técnica de Kjeldahl y con los valores de clorofila determinado con extracción con acetona a 80% (Reeves *et al.*, 1993).

En plantas *in vitro* y en plantas *ex vitro* al final de cada ensayo se midió además de las variables mencionadas anteriormente, el área foliar por planta, el peso fresco (PF) y seco (PS) del vástago, de las raíces y de las hojas. El área foliar de cada planta se determinó mediante un software de imágenes de dominio público (Imagen J, versión 1.44). Para ello, se deshojaron las plantas y se fotografiaron con cámara digital Kodak Easy Share C653 a 6,1 megapíxeles con un referencia de longitud conocida (*i.e.* regla milimetrada). Las imágenes posteriormente fueron analizadas con Image J empleando la herramienta de selección difusa conocida como varita mágica la cual está diseñada para seleccionar áreas de la imagen activa basada en la similitud del color con una tolerancia de 25%. Posteriormente se cuantificó el área seleccionada mediante la herramienta para medir, lo cual se realizó hoja por hoja, obteniéndose el área foliar de cada planta mediante la sumatoria de las áreas individuales.

Todas las plantas de cada tratamiento fueron pesadas con balanza analítica de precisión (0,0001) para determinar el PF, y luego fueron trasferidas a una estufa a una temperatura de 70°C hasta peso constante para obtener el PS.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, utilizando el programa estadístico InfoStat/P versión 1.1 (InfoStat, 2002). Cuando se encontró diferencias significativas con el análisis de varianza, se procedió a comparar las medias aritméticas de las variables evaluadas mediante el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Resultados:

Experimento 1: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre la aclimatización de plantas de mandioca.

La supervivencia de plantas de mandioca evaluadas a los 7, 14 y 21 días de aclimatización en cámara de cultivo y a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatización) no evidenció diferencias significativas en relación al genotipo y a las dosis probadas del bioestimulante ($P > 0,05$). Los valores promedios de supervivencia fueron altos (89 % a 100%), incluso en plantas transferidas a las condiciones ambientales externas (Fig. 2 a, b, c y d), momento en que la temperatura media (18,8°C) fue inferior a la de la cámara de cultivo (27°C) y la radiación PAR media (513 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) fue mayor (más de 3 veces) al valor registrado en la cámara de cultivo (116 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Tabla 3).

En lo que se refiere a los parámetros de crecimiento de las plantas *in vitro* transferidas a condiciones *ex vitro* se puede decir que a los 7 días de la aclimatización en cámara de cultivo se registraron diferencias significativas debida al genotipo sobre la altura de plantas de mandioca (Fig. 3 a), el número de hojas secas (Fig. 3 c) y el número de hojas totales por planta (Fig. 3 d). El cv. Rocha presentó las plantas más altas (Fig. 3 a) y mayor número de hojas secas (Fig. 3 c) y el cv. Bl. Sta. Catarina la mayor cantidad de hojas totales por planta (Fig. 3 d). El número de nudos no evidenció diferencias significativas en relación al genotipo y a las dosis probadas del bioestimulante (Fig. 3 b).

A los 14 días de la aclimatización en cámara de cultivo se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre la altura de plantas de mandioca (Fig. 4 a), el número de nudos (Fig. 4 b) y el número de hojas totales por planta (Fig. 4 d). En el cv. Rocha se registraron las plantas de mayor altura (Fig. 4 a) y en cv. Bl. Sta. Catarina se observaron las plantas con mayor número de nudos (Fig. 4 b) y hojas totales por planta (Fig. 4 d). El número de hojas secas no manifestó diferencias significativas en relación al genotipo y a las dosis probadas del bioestimulante (Fig. 4 c).

A los 21 días de la aclimatización en cámara de cultivo se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre la altura de plantas de mandioca (Fig. 5 a) y el número de nudos (Fig. 5 b). En el número de hojas totales por planta evidenció una interacción significativa ($P \leq 0,05$) entre el genotipo y distintas dosis de Inicium® (Fig. 5 d). En el cv. Bl. Sta. Catarina se registró el mayor número de hojas, destacándose el tratamineto testigo de dicho cultivar en relación a

los restantes tratados o no con Inicium® (Fig. 5 d). El número de hojas secas no manifestó diferencias significativas en relación al genotipo y a las dosis probadas del bioestimulante (Fig. 5 c).

A los 28 días totales de aclimatización se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre el número de hojas secas, siendo el cv. Palomita la que menor hojas secas presentó (Fig. 6 c). En la altura de plantas de mandioca (Fig. 6 a), el número de nudos (Fig. 6 b) y en el número de hojas totales por planta (Fig. 6 d) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

En lo referente al contenido relativo de clorofila medido con SPAD manifestó diferencias estadísticas en relación a la aplicación del bioestimulante respecto del control ($P<0,0001$) y al genotipo siendo más alto en el cv. Bl. Sta. Catarina ($P<0,0003$). A los 14 y 21 días de la aclimatización en cámara de cultivo y a los 28 días totales de aclimatización, la interacción entre el genotipo y las diferentes dosis de Inicium® resultó significativa sobre el contenido relativo de clorofila ($P\leq0,05$). A los 14 días solamente el cv. Rocha demostró contenidos de clorofila mayores en plantas tratadas con Inicium® respecto del tratamiento testigo (Fig. 7 a). A los 21 días, en los tres cultivares se denotó el efecto positivo de la aplicación de Inicium® (Fig. 7 b), lo cual a los 28 días totales de aclimatización se mantuvo en los cvs. Rocha y Bl. Sta. Catarina (Fig. 7 c), siendo mejor la dosis de 22,7 ml respecto del control.

A los 28 días totales de aclimatización se observó interacción significativa entre el genotipo y la aplicación de Inicium®, para el PF y el PS de tallo (Fig. 8 a y d) y raíces (Fig. 8 b y e) y en el PS de hojas. (Fig. 8 f). El PF y PS de tallo (Fig. 8 a y d) y raíces (Fig. 8 b y e) y el PS de hojas (Fig. 8 f) se vió favorecido notablemente con la aplicación de Inicium® en el cv. Rocha. En el cv. Bl. Sta. Catarina se registraron valores altos en el PF y el PS de tallo (Fig. 8 a y d) y raíces (Fig. 8 b y e) y en el PS de hojas respecto del cv. Palomita (Fig. 8 f), aunque no se evidenció diferencias significativas cuando se compararon las aplicaciones de Inicium® vs. los respectivos testigos. El genotipo generó diferencias estadísticas significativas para el PF de hojas (Fig. 8 c) y el área foliar (Fig. 8 g), siendo el cv. Bl. Sta. Catarina el que manifestó mayor PF de hojas (Fig. 8 c) y el mayor área foliar (Fig. 8 g) y el cv. Palomita el que presentó los valores más bajos. En la variable PF de hojas además de observarse diferencias debidas al genotipo, se evidenciaron diferencias significativas relacionadas a las diferentes dosis aplicadas de Inicium®, siendo la menor dosis (I1) la que generó mayor peso (Fig. 8 c).

Independientemente de los cultivares, las variables altura de plantas de mandioca (Fig. 9 a), número de nudos (Fig. 9 b), hojas secas (Fig. 9 c), y hojas totales por planta (Fig. 9 d), son mayores al final de la aclimatización (28 días de su transferencia) respecto de su condición inicial como planta regenerada *in vitro*.

En plantas de mandioca *in vitro* y *ex vitro* luego de 28 días de su transferencia se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre la altura de plantas de mandioca (Fig. 9 a) y el número de nudos (Fig. 9 b); en plantas aclimatizadas del cv. Rocha se observaron las plantas más altas (Fig. 9 a) y en el cv. Palomita el menor número de nudos (Fig. 9 b).

En la variable número de hojas secas además de presentarse diferencias entre las plantas *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro* se manifiestaron diferencias debidas al genotipo (Fig. 9 c).

El contenido medio de clorofila medido con SPAD no evidenció diferencias significativas ($P>0,05$) cuando se compararon plantas *in vitro* sin aclimatizar con plantas *ex vitro* aclimatizadas luego de 28 días de su transferencia, independientemente del cultivar (Fig. 9 e).

Las variables PF y PS de tallo (Fig. 11 a y d) y hojas (Fig. 11 c y f) y el área foliar (Fig. 11 g) fueron mayores al final de la aclimatización (28 días totales de aclimatización) respecto de su condición inicial como planta regenerada *in vitro*, independientemente del genotipo,. En el caso del PF y PS de raíces se observaron diferencias entre plantas *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro* luego de 28 días de su transferencia en los cvs. Rocha y Bl. Sta. Catarina. En el cv. Palomita no se observaron diferencias significativas en las variables PF y PS de raíces (Fig. 11 b y e).

Figura 2: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre la supervivencia en plantas de mandioca a los 7 días (a), 14 días (b) y 21 días (c) de la aclimatación en cámara de cultivo y a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatación) (d).

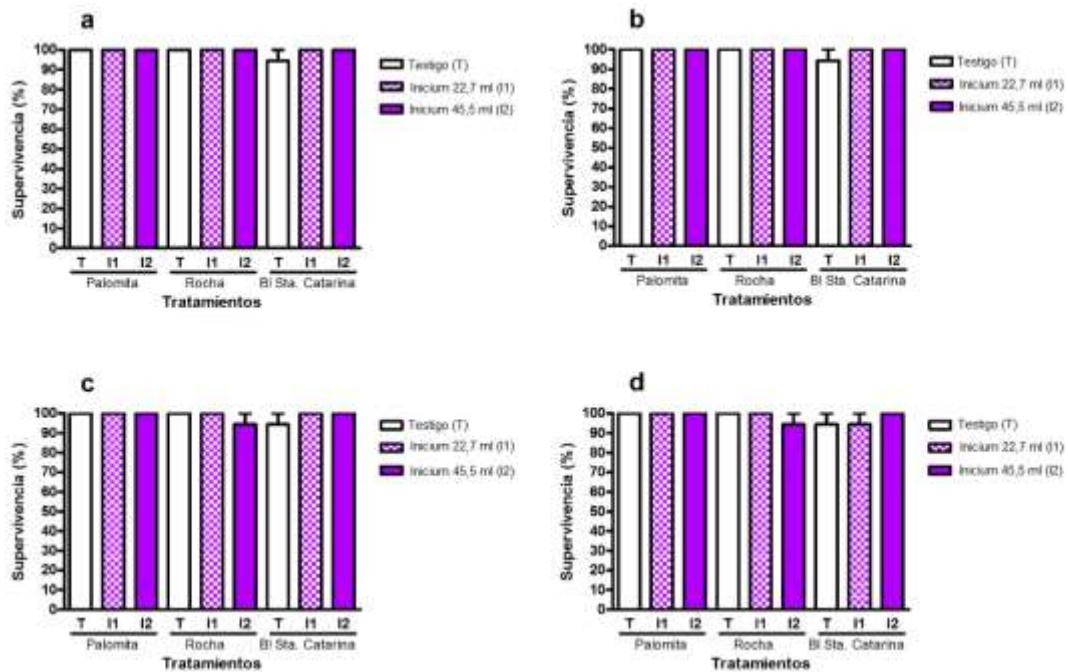
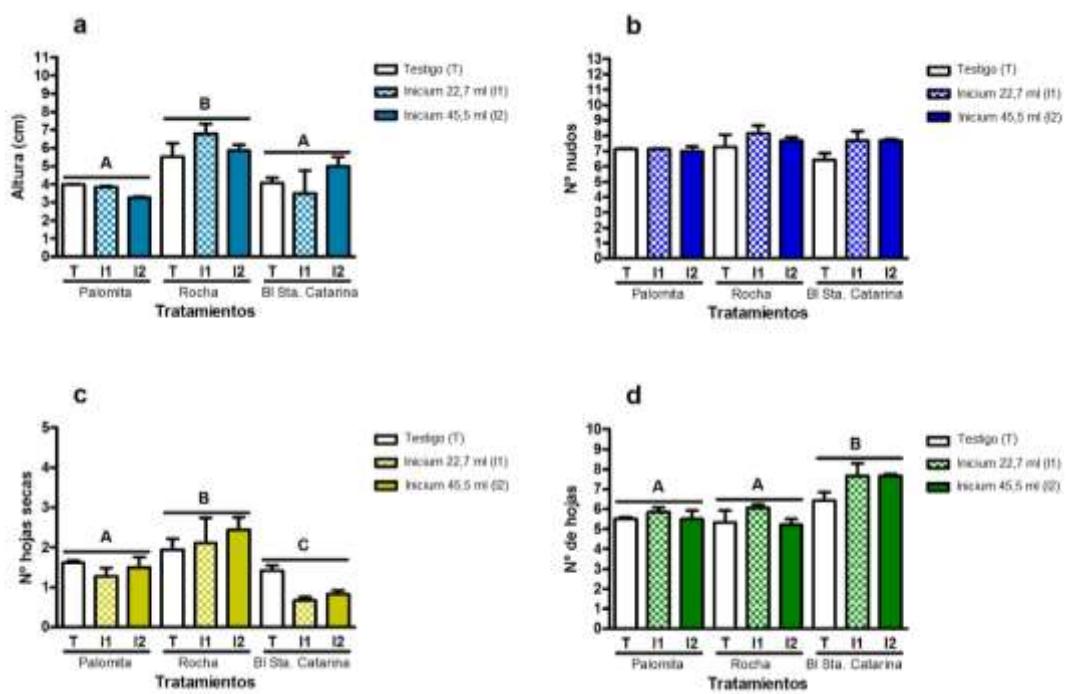
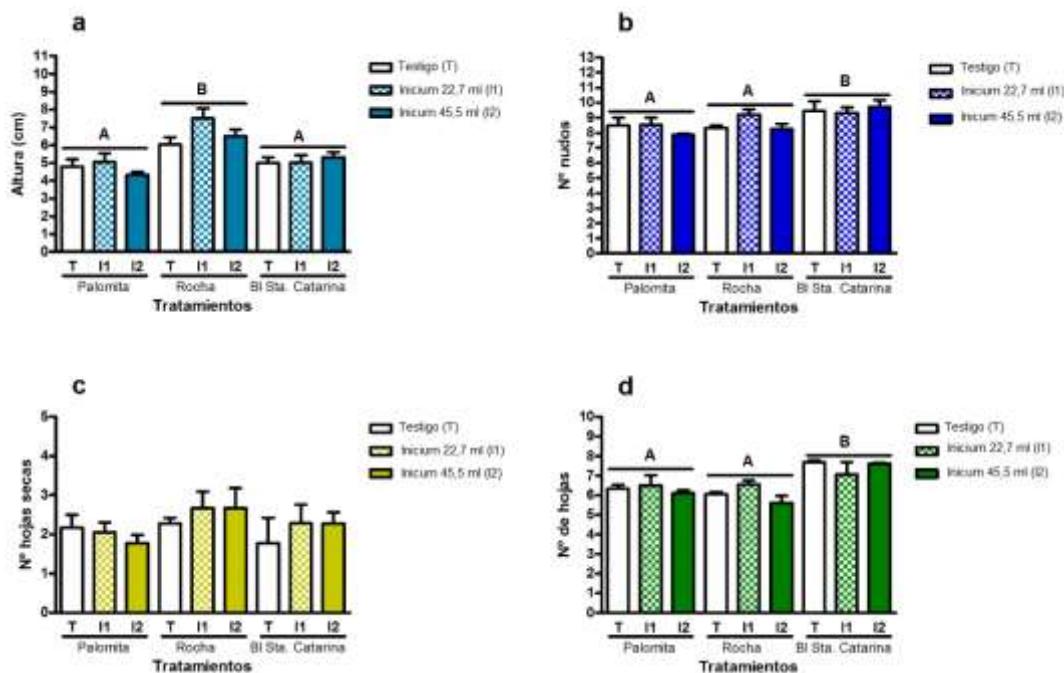


Figura 3: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre la altura de plantas de mandioca (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d), a los 7 días de la aclimatación en cámara de cultivo.



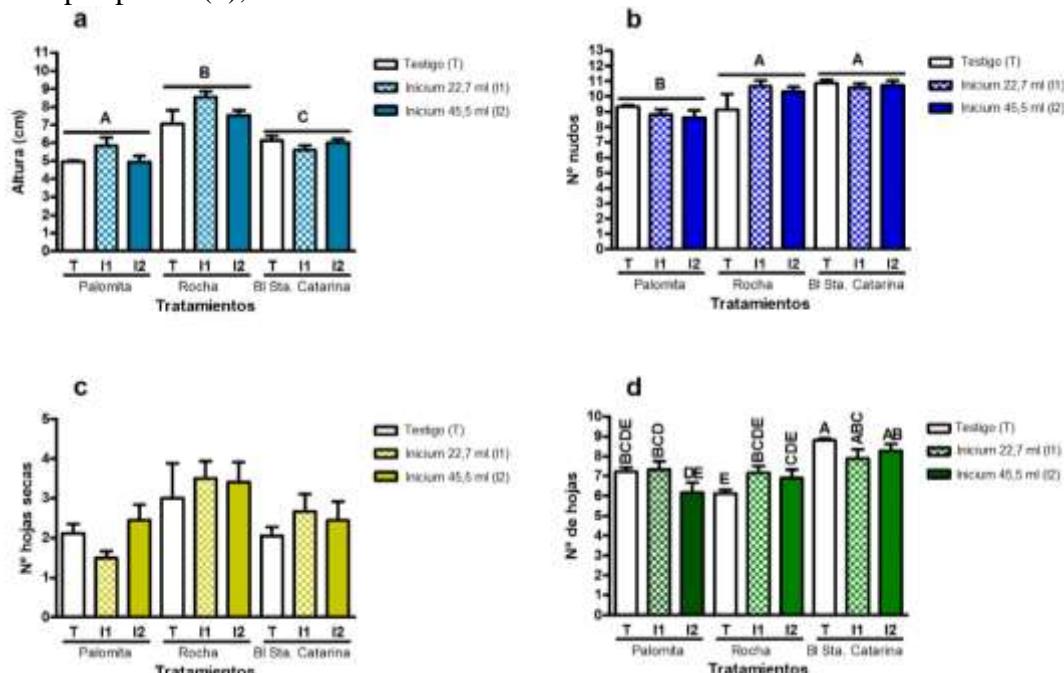
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 4: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre la altura de plantas de mandioca (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d), a los 14 días de la aclimatización en cámara de cultivo.



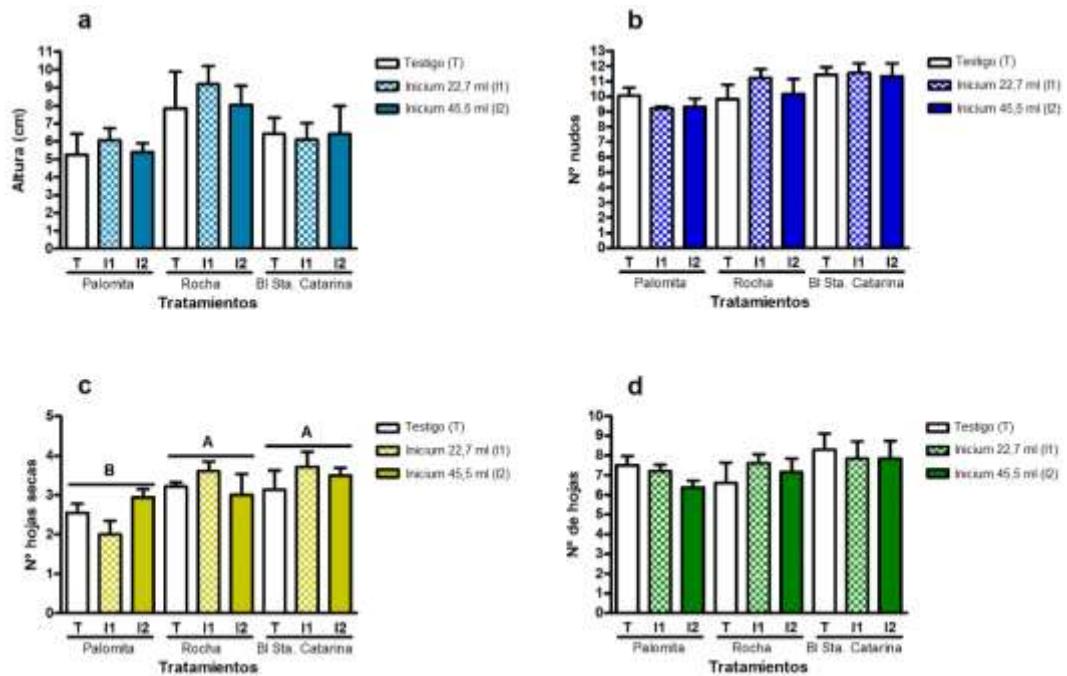
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 5: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre la altura de plantas de mandioca (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d), a los 21 días de la aclimatización en cámara de cultivo.



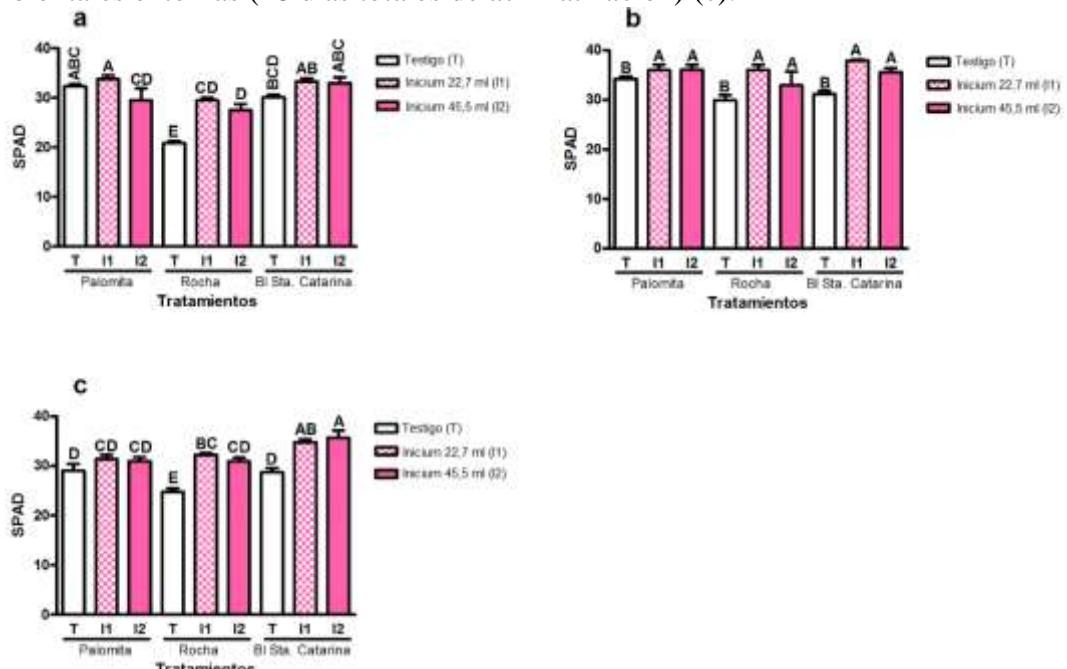
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas) y a la interacción genotipo vs. dosis del bioestimulante (d) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 6: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre la altura de plantas de mandioca (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d) a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatación).



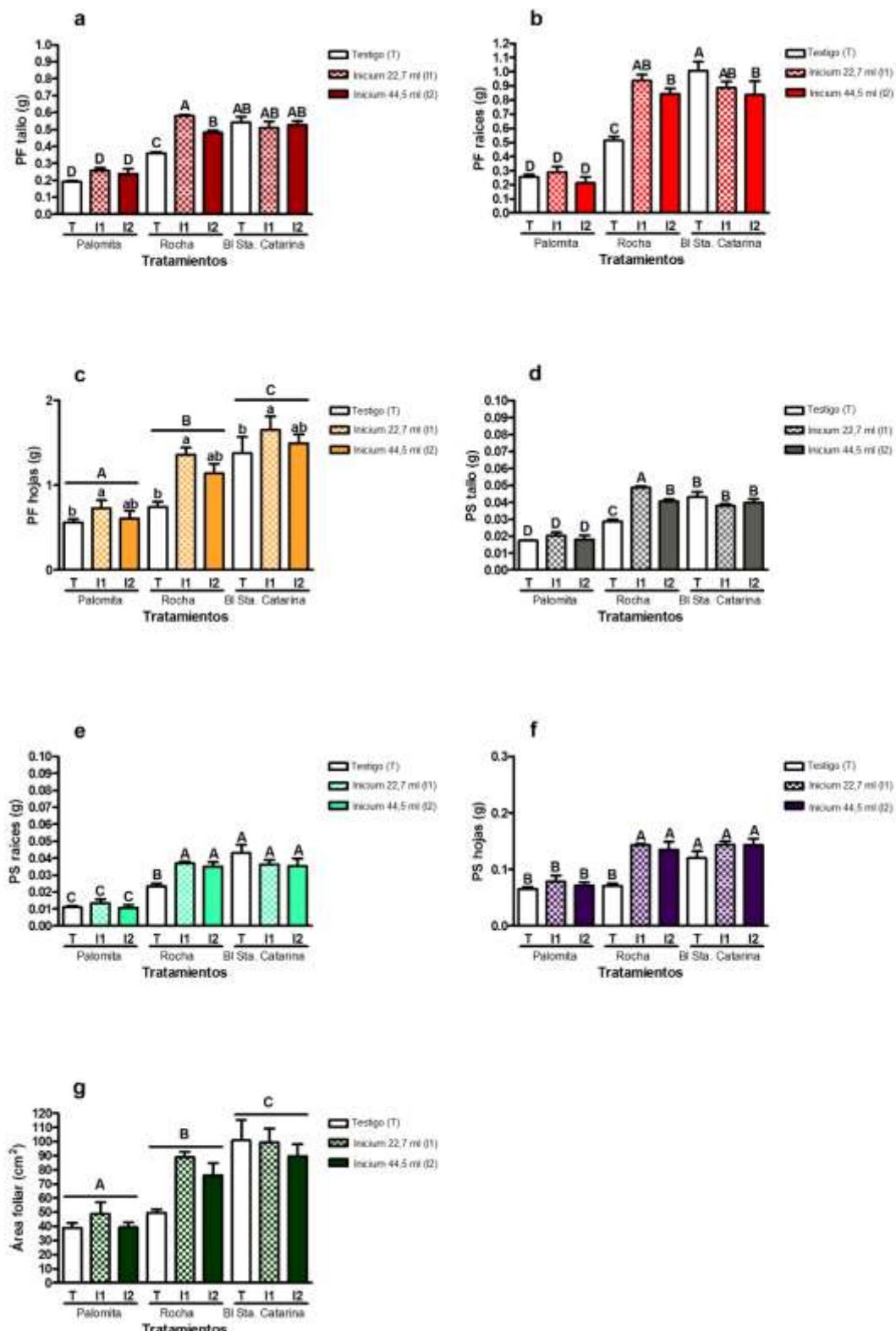
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 7: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre el contenido relativo de clorofila medido con SPAD en plantas de mandioca a los 14 días (a) y 21 días (b) de la aclimatización en cámara de cultivo y a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatización) (c).



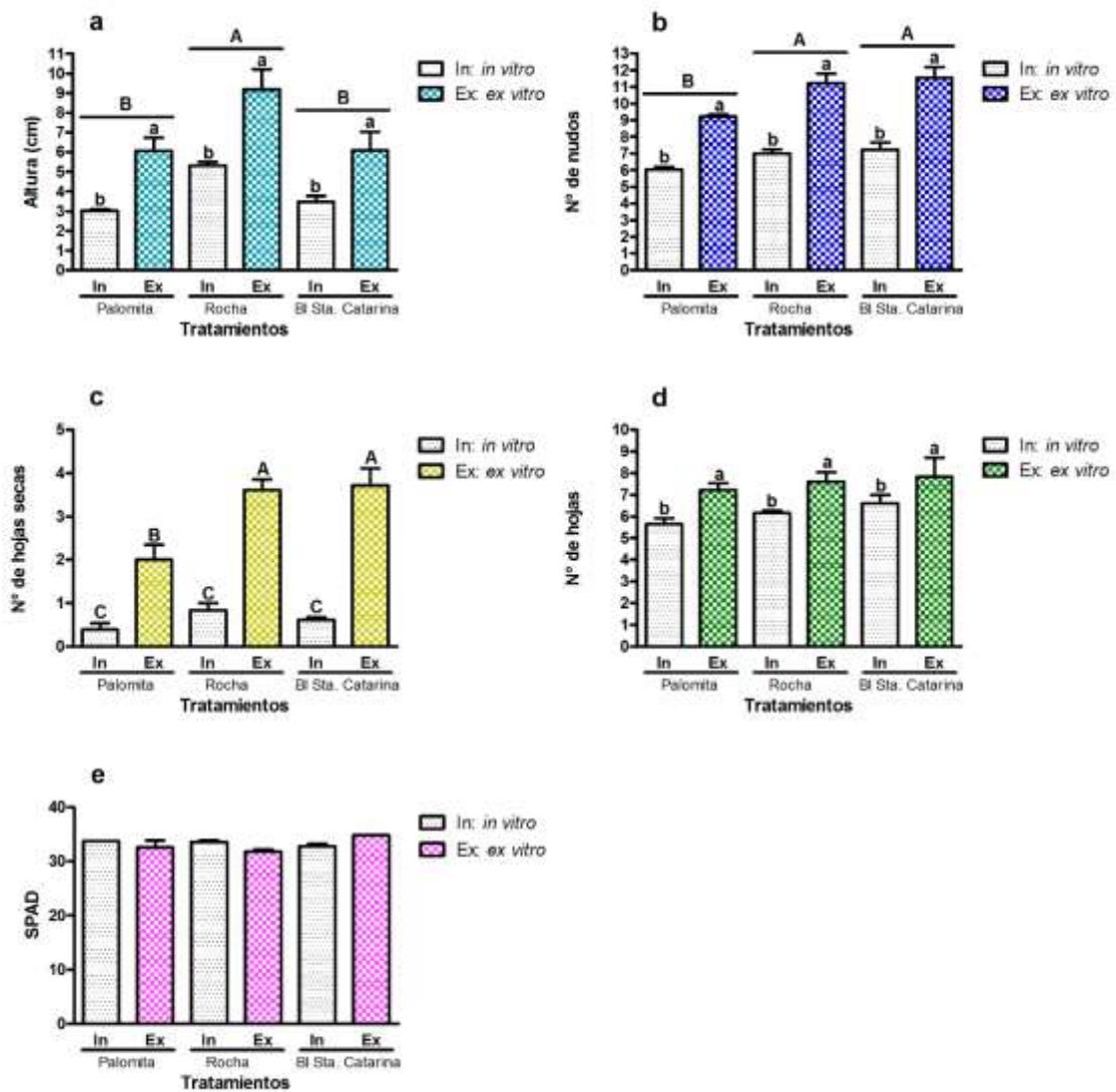
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas a la interacción genotipo vs. dosis del bioestimulante (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 8: Efecto del genotipo y la aplicación de distintas dosis de Inicium® sobre el peso fresco (PF) de tallo de plantas de mandioca (a), raíces (b), hojas (c), peso seco (PS) de tallo (d), raíces (e), hojas (f) y área foliar (g) a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatación).



Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas), a las dosis del bioestimulante (minúsculas) y su interacción (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 9: Altura de plantas (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c), número de hojas totales (d) y contenido relativo de clorofila SPAD (e) en plantas *in vitro* de mandioca sin aclimatizar y en plantas *ex vitro* aclimatizadas luego de 28 días de su transferencia.



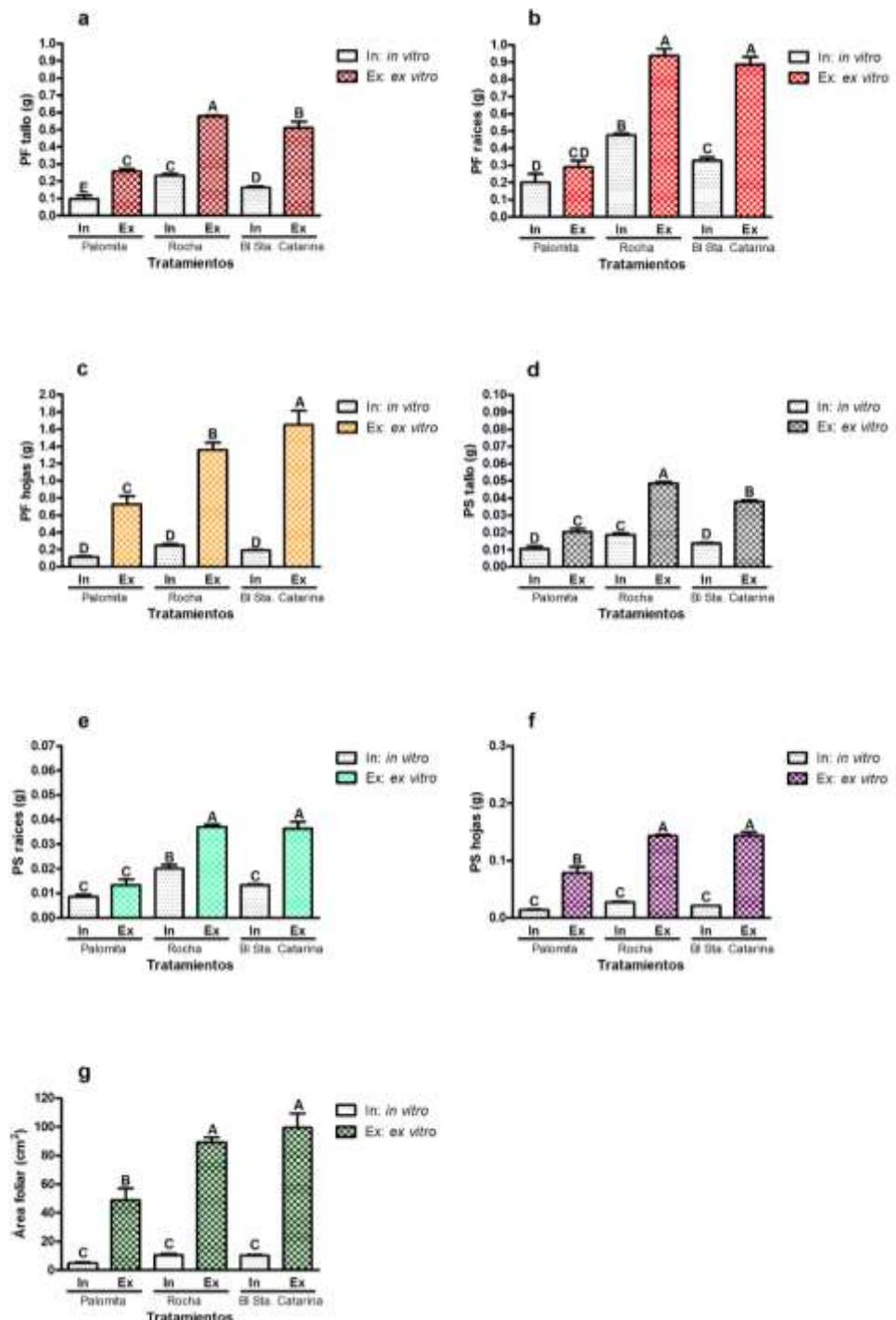
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas), a su condición *in vitro* vs. *ex vitro* (minúsculas) y su interacción (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 10: Aspecto de las plantas de 3 cultivares de mandioca regeneradas *in vitro* al momento de ser transferidas a condiciones *ex vitro* y plantas aclimatizadas *ex vitro* luego de 28 días de su transferencia.



Referencias: a, c y e: plantas regeneradas *in vitro*; b, d y f: plantas aclimatizadas *ex vitro* tratadas con 22,7 ml de Inciuum ®, luego de 28 días de su transferencia; a y b: plantas del cultivar Palomita; c y d: plantas del cultivar Rocha; e y f: plantas del cultivar Blanca de Santa Catarina; a-f: barras = 5 cm.

Figura 11: Peso fresco (PF) de tallo (a), PF de raíces (b), PF de hojas (c), peso seco (PS) de tallo (d), PS de raíces (e), PS de hojas (f) y área foliar (g) en plantas *in vitro* de mandioca sin aclimatizar y en plantas *ex vitro* aclimatizadas luego de 28 días de su transferencia.



Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas) y a su condición *in vitro* vs. *ex vitro* (minúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Experimento 2: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre la aclimatización.

La supervivencia de plantas de mandioca evaluadas a los 7, 14 y 21 días de aclimatización en cámara de cultivo y a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatización) no evidenció diferencias significativas en relación al genotipo y a las edades de las plantas (30, 45 y 60 días) ($P>0,05$). Los valores promedios de supervivencia fueron altos (89 % a 100%), incluso en plantas transferidas a la intemperie (Fig. 12 a, b, c, d), momento en que la temperatura media (24,69°C) fue inferior a la de la cámara de cultivo (27°C) y la radiación PAR media (364 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fue mayor (2 veces más) al valor registrado en la cámara de cultivo (116 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Tabla 4).

A los 7 días de la aclimatización en cámara de cultivo se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre el número de nudos (Fig. 13 b), número de hojas secas (Fig. 13 c) y número de hojas totales por planta (Fig. 13 d); el cv. Bl. Sta. Catarina presentó el mayor número de hojas (Fig. 13 d) y mayor número de nudos (Fig. 13 b). La interacción entre el genotipo y la edad de las plantas *in vitro* fue significativa sobre la altura de plantas ($P\leq0,05$), registrándose mayores valores de altura cuando se emplearon plantas de 45 y 60 días de edad en los cvs. Palomita y Rocha, y plantas de 45 días en el cv. Bl. Sta. Catarina (Fig. 13 a). También se registraron diferencias significativas debidas a la edad de las plantas *in vitro* sobre el número de nudos (Fig. 13 b) y hojas secas (Fig. 13 c); plantas de 45 y 60 días manifestaron un mayor número de nudos y hojas secas en los 3 cultivares (Fig. 13 b y c).

A los 14 días de la aclimatización en cámara de cultivo, se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre la altura de plantas (Fig. 14 a), número de nudos (Fig. 14 b) y número de hojas secas por planta (Fig. 14 c). El cv. Rocha presentó las plantas de mayor altura (Fig. 14 a), en el cv. Bl. Sta. Catarina se observó el mayor número de nudos (Fig. 14 b) y en el cv. Palomita las plantas de menor número de hojas secas (Fig. 14 c). Además se registraron, diferencias significativas debidas a las distintas edades de las plantas *in vitro* sobre el número de nudos; con las edades de 45 y 60 se observaron plantas con mayor número de nudos en todas los 3 cultivares (Fig. 14 b). En la variable número de hojas totales por planta no se registraron diferencias significativas debidas al genotipo ni a las distintas edades de las plantas *in vitro* ($P>0,05$) (Fig. 14 d).

A los 21 días de la aclimatización en cámara de cultivo, se observaron diferencias significativas debidas al genotipo en la altura de plantas de mandioca (Fig. 15 a) y en el número de nudos (Fig. 15 b). En el cv. Rocha se evidenciaron las plantas de mayor altura (Fig. 15 a) y en el cv. Bl. Sta. Catarina se observaron las plantas con mayor número de nudos (Fig. 15 b). No se registraron diferencias significativas debidas al genotipo ni a las distintas edades de las plantas *in vitro* sobre el número de hojas totales ($P>0,05$) (Fig. 15 d). Sin embargo, en el número de hojas secas por planta, la interacción entre el genotipo y las distintas edades de las plantas *in vitro* fue significativa ($P\leq0,05$) (Fig. 15 c).

A los 28 días totales de aclimatización, se observaron diferencias significativas debidas al genotipo sobre la altura de plantas de mandioca (Fig. 16 a), el número de nudos (Fig. 16 b), el número de hojas secas (Fig. 16 c) y el número de hojas totales por planta (Fig. 16 d). El cv. Rocha presentó las plantas más altas (Fig. 16 a); en el cv. Bl. Sta. Catarina se observó las plantas con mayor número de nudos (Fig. 16 b) y número de hojas totales (Fig. 16 d) y en el cv. Palomita se registró el menor número de hojas secas (Fig. 16 c). Se evidenció además diferencias significativas debidas a las distintas edades sobre el número de nudos y número de hojas secas. Las plantas de 45 días presentaron los mayores valores en el número de nudos con respecto a las de 30 días (Fig. 16 b) y plantas de 45 y 60 días de edad fueron las que mostraron el mayor número de hojas secas en los 3 cultivares (Fig. 16 c).

A los 14 y 21 días de la aclimatización en cámara de cultivo y a los 28 días totales de aclimatización sólo se notaron diferencias significativas debidas al genotipo sobre el contenido relativo de clorofila ($P \leq 0,05$).(Fig. 17 a, b y c). A los 14 y 21 días en el cv. Palomita se registraron los mayores valores de el contenido relativo de clorofila (Fig. 17 a y b) y a los 28 días totales de aclimatización en los cvs. Palomita y Bl. Sta. Catarina (Fig. 17 c). En las 3 fechas de toma de datos el cv Rocha demostró los menores valores del contenido relativo de clorofila respecto de los otros cultivares evaluados.

A los 28 días de aclimatización, se evidenciaron diferencias significativas debidas al genotipo en las variables PF y PS de tallos (Fig. 18 a y d), raíces (Fig. 18 b y e) y hojas (Fig. 18 c y f) y área foliar por planta (Fig. 18 g). En el PF y PS de tallo el cv. Palomita presentó menores pesos que el cv. Bl. Sta. Catarina y el cv. Rocha (Fig. 18 a y d). Se registraron mayores PF y PS de raíces (Fig. 18 b y e) y hojas (Fig. 18 c y f) y mayores valores de área foliar por planta (Fig. 18 g) en el cv. Bl. Sta. Catarina. Se observaron diferencias significativas debidas a las diferentes edades de las plantas *in vitro* empleadas para la aclimatización sobre el PF de tallos de plantas aclimatizadas, obteniéndose mayores pesos con plantas de 45 y 60 días de edad (Fig. 18 a).

Independientemente del genotipo, la altura de plantas de mandioca (Fig. 19 a), el número de nudos (Fig. 19 b), número de hojas secas (Fig. 19 c), número de hojas totales por planta (Fig. 18 d).y contenido relativo de clorofila (Fig. 19 e) fueron mayores al final de la aclimatización (28 días de su transferencia) respecto de su condición inicial como planta regenerada *in vitro*.

En plantas de mandioca *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro* se registraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre el número de nudos (Fig. 19 b), número de hojas secas (Fig. 19 c), número de hojas totales por planta (Fig. 19 d) y contenido relativo de clorofila medido con SPAD (Fig. 19 e). En plantas aclimatizadas del cv. Bl. Sta. Catarina, se observaron las plantas con mayor número de nudos (Fig. 19 b) y número de hojas totales por planta (Fig. 19 d). Las plantas del cv. Rocha demostraron los menores contenidos relativos de clorofila (Fig. 19 e). En el cv. Palomita se cuantificó el menor número de hojas secas (Fig. 19 c).

Independientemente de los cultivares, las variables PF y PS de tallo (Fig. 20 a y d) y hojas (Fig. 20 c y f) y el área foliar (Fig. 20 g) fueron mayores al final de la aclimatización (28 días de su transferencia) respecto de su condición inicial como planta regenerada *in vitro*. En el caso del PF y PS de raíces (Fig. 20 b y e) se observaron diferencias entre plantas *in vitro* y las aclimatizadas *ex vitro* sólo en los cvs. Rocha y Bl. Sta. Catarina. En el cv. Palomita no se observaron diferencias significativas en las variables PF y PS de raíces.

En plantas de mandioca *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro* se notaron diferencias significativas debidas al genotipo sobre el PF y PS de tallo (Fig. 20 a y d) y PF de hojas (Fig. 20 c). En el cv. Palomita se registraron los menores PF y PS de tallo (Fig. 20 a y d) y en el cv. Bl. Sta. Catarina se observaron los mayores PF de hojas (Fig 20 c).

Figura 12: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre la supervivencia a los 7 días (a), 14 días (b) y 21 días(c) de la aclimatación en cámara de cultivo y a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatación) (d).

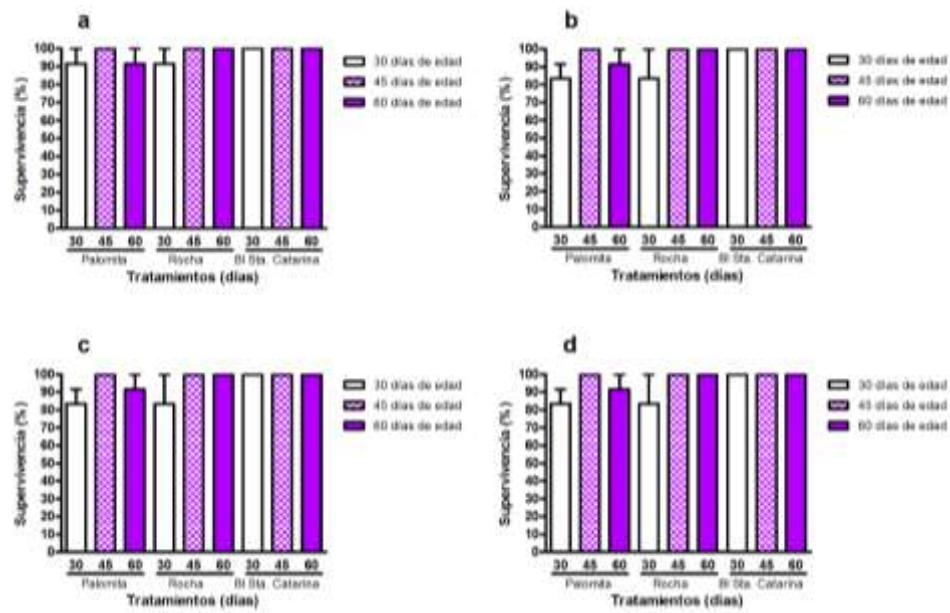
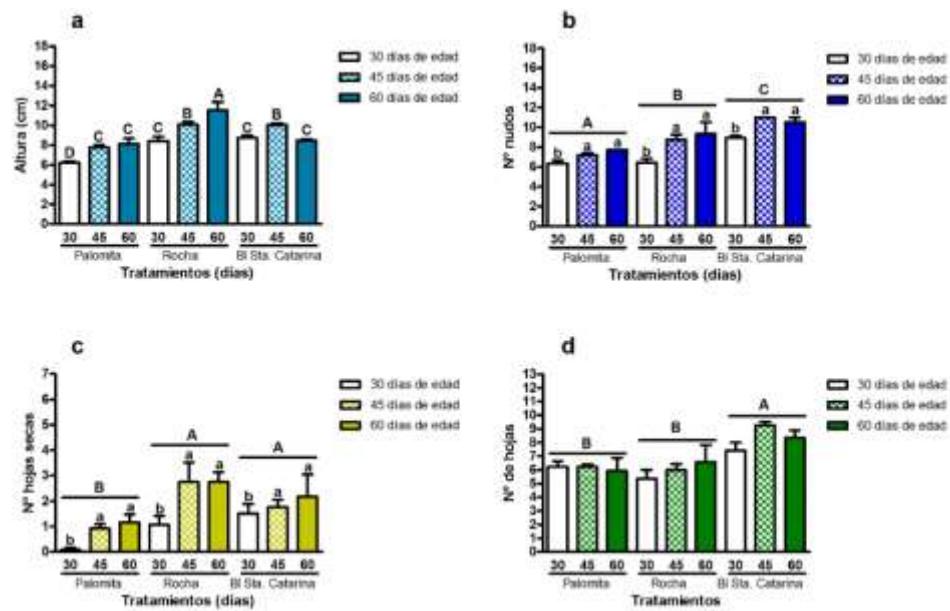
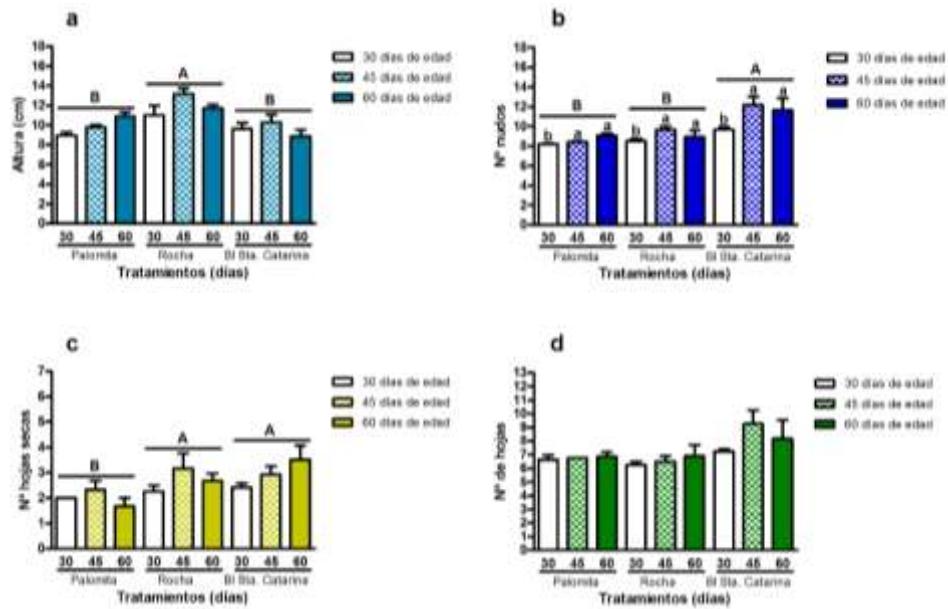


Figura 13: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre la altura de plantas (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d), a los 7 días de la aclimatación en cámara de cultivo.



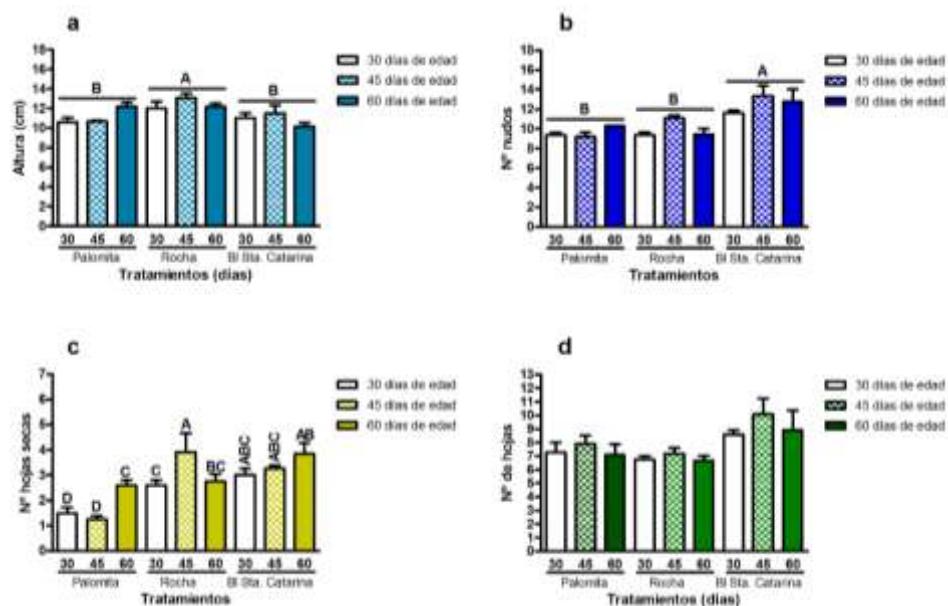
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo, a las dosis del bioestimulante (minúsculas) y su interacción (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 14: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre la altura de plantas (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d), a los 14 días de la aclimatación en cámara de cultivo.



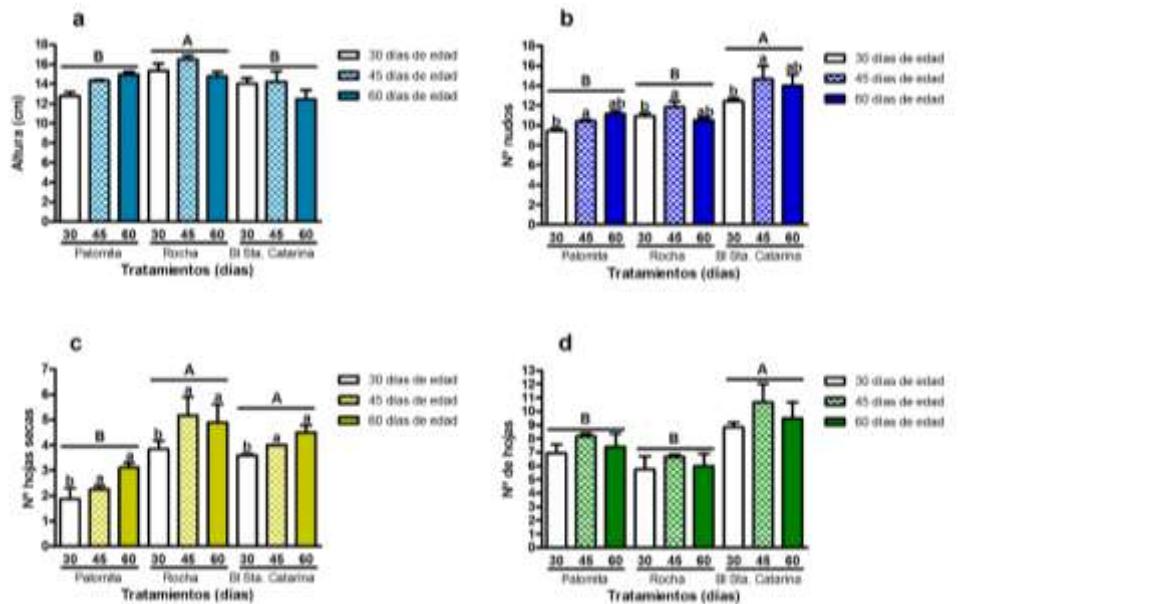
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo y a las dosis del bioestimulante (minúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 15: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre la altura de plantas (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d), a los 21 días de la aclimatación en cámara de cultivo.



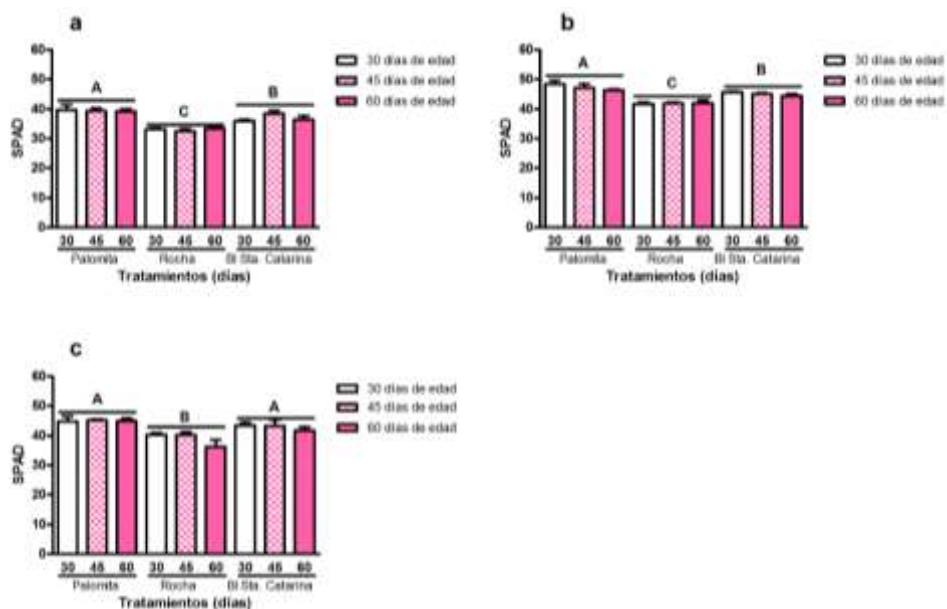
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo y a la interacción genotipo vs. dosis del bioestimulante según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 16: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre la altura de plantas (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c) y número de hojas totales por planta (d), a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatación).



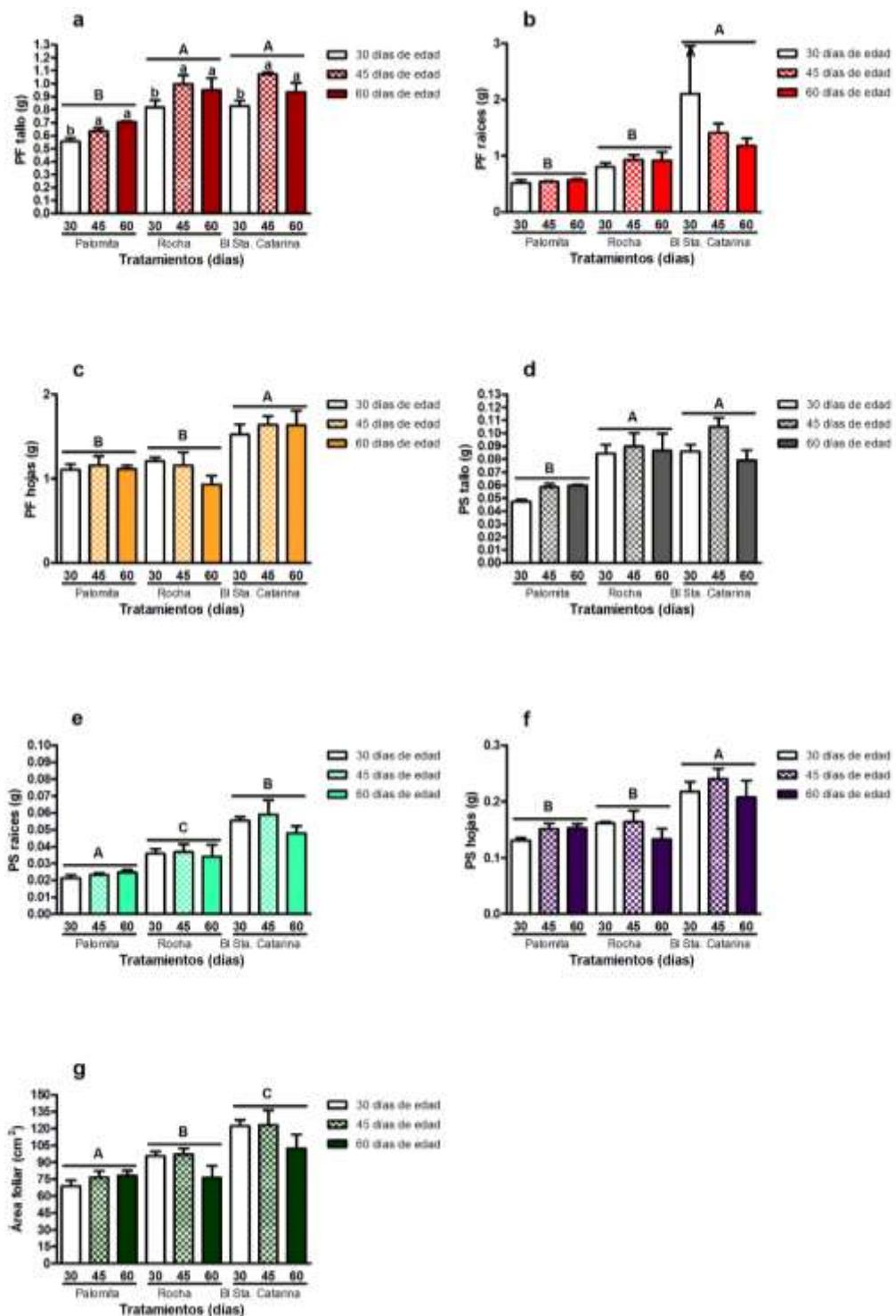
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo y a las dosis del bioestimulante (minúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 17: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre el contenido relativo de clorofila medido con SPAD a los 14 días (a) y 21 días (b), de la aclimatización en cámara de cultivo y a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatación).



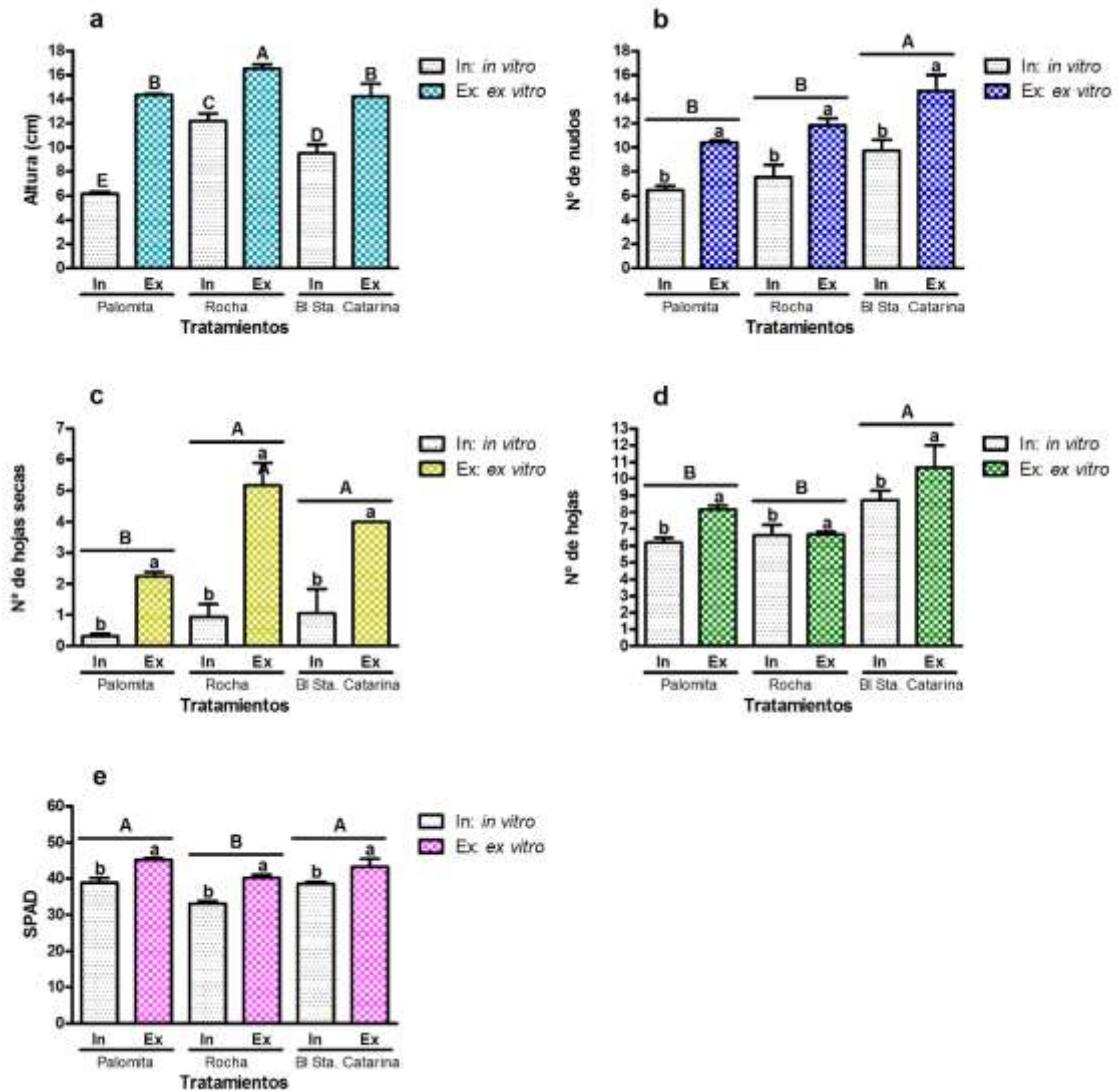
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 18: Efecto del genotipo y la edad de las plantas *in vitro* de mandioca sobre el peso fresco de tallo de plantas de mandioca (a), peso fresco de raíces (b), peso fresco de hojas (c), peso seco de tallo (d), peso seco de raíces (e), peso seco de hojas (f) y área foliar (g) a los 8 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatación).



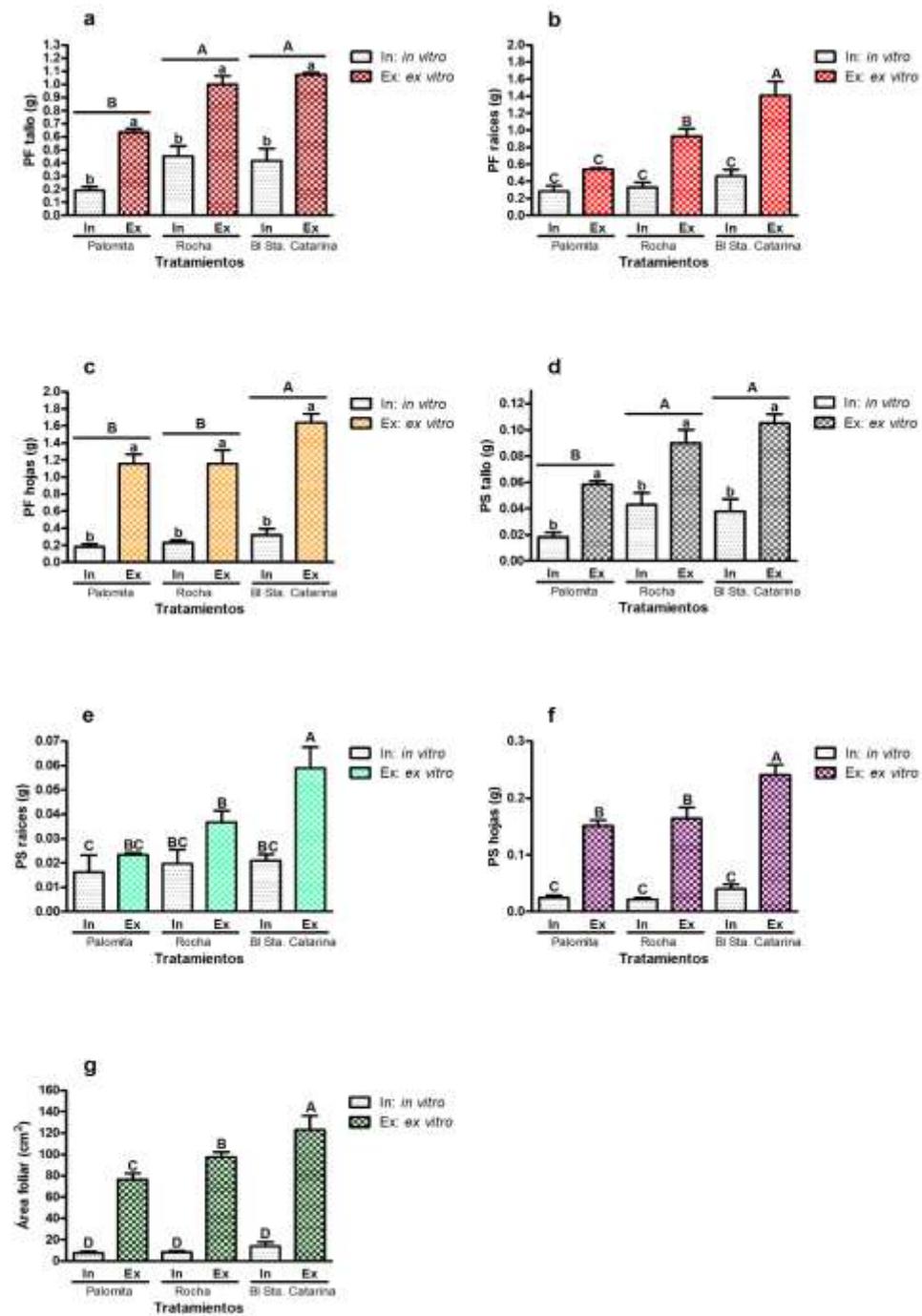
Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas) y a las dosis del bioestimulante (minúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 19: Altura de plantas (a), número de nudos (b), número de hojas secas (c), número de hojas totales (d) y contenido relativo de clorifila medido con SPAD (e) en plantas *in vitro* de mandioca sin aclimatizar y en plantas *ex vitro* aclimatizadas derivadas de plantas de 45 días de edad luego de 28 días de su transferencia.



Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas), a su condición *in vitro* vs. *ex vitro* (minúsculas) y su interacción (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0.05$).

Figura 20: Peso fresco (PF) de tallo (a), PF de raíces (b), PF de hojas (c), peso seco (PS) de tallo (d), PS de raíces (e), PS de hojas (f) y área foliar (g) de plantas *in vitro* de mandioca sin aclimatizar y en plantas *ex vitro* aclimatizadas derivadas de plantas de 45 días de edad luego de 28 días de su transferencia.



Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas debidas al genotipo (mayúsculas), a su condición *in vitro* vs. *ex vitro* (minúsculas) y su interacción (mayúsculas) según el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 21: Aspecto de las plantas de mandioca cv. Blanca de Santa Catarina regeneradas *in vitro* con 30, 45 y 60 días de edad al momento de ser transferidas a condiciones *ex vitro* y plantas aclimatizadas *ex vitro* luego de 28 días de su transferencia.



Referencias: a, c y e: plantas regeneradas *in vitro* con 30, 45 y 60 días de edad, respectivamente; b, d y f: plantas aclimatizadas *ex vitro* tratadas con 22,7 ml de Incium ®, luego de 28 días de su transferencia; a-f: barras = 5 cm.

Discusión:

La transferencia de las plantas *in vitro* a condiciones *ex vitro* es la etapa final de la micropropagación y es uno de los momentos más críticos del proceso ya que el mayor porcentaje de pérdidas de plantas producidas *in vitro* ocurren en su fase de transferencia al suelo (Roca, 1991). El transplante es un proceso traumático para las plantas, estas sufren un estrés microclimático cuando pasan de los frascos cerrados a las mini cámaras húmedas (Segovia *et al.*, 2002), esto se debe a que durante el cultivo *in vitro* las plántulas crecen bajo condiciones disímiles al ambiente externo, se desarrollan bajo condiciones especiales, en tubos cerrados casi herméticos al aire que impide la contaminación microbiana, disminuye la turbulencia del aire que aumenta la capa límite de la hoja y restringe el flujo de entrada de CO₂ y la salida de gases de los haces conductores. La atmósfera interna se caracteriza por presentar una variación diurna considerable en la concentración de CO₂, humedad relativa elevada, temperatura constante o en un rango considerado óptimo para las plantas e intensidad lumínica baja. A su vez, el medio de cultivo está compuesto por concentraciones elevadas de azúcares como fuente de carbono y energía, sales y reguladores del crecimiento. Todas estas condiciones dan como resultado la formación de vitroplantas que pueden presentar anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas (Preece y Sutter, 1991; Koza, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1992, 1997; Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994; Desjardins, 1995; Koza y Smith, 1995; Mroginski *et al.*, 2010), caracterizadas por tener un debilitado aparato fotosintético (Luya, 1999) debido a los bajos contenidos de pigmentos del aparato fotosintético y el desarrollo de cloroplastos con granas desorganizadas (Preece y Sutter, 1991; Inoue *et al.*, 1999), retraso en el desarrollo de cutículas cerasas (Luya, 1999; Amar *et al.*, 1995), escasa funcionalidad del aparato estomático debido a la alteración en la forma de las células oclusivas (Luya, 1999; Ziv, 1991; Diez y Gil, 1999), ineficiencia de los tejidos de sostén debido a la reducida presencia de colénquima y esclerénquima (Preece y Sutter, 1991; Framton *et al.*, 1998), absorción y transporte de agua ineficiente, debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el vástago y excesiva pérdida de agua por transpiración que puede generar la muerte por deshidratación (Luya, 1999).

Las plantas deberán corregir todas estas características anormales cuando son transferidas al ambiente externo, por esta razón es necesaria la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de condiciones *in vitro* a *ex vitro*.

Este período de adaptación gradual al nuevo hábitat es llamado fase o etapa de aclimatización (Mroginski *et al.*, 2010). La aclimatización es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Agramonte Peñalver, 1998).

En el presente estudio se observó que la supervivencia *ex vitro* de plantas de mandioca evaluadas durante 28 días totales de aclimatización (21 días en cámara de cultivo y 7 días en condiciones ambientales externas) fue alta (89% a 100%), no manifestando diferencias significativas debidas al genotipo y a las diferentes dosis probadas de un bioestimulante (Inicium ®). Resultados similares han sido informado para seis *landraces* brasileros de mandioca (92%) (Pedroso de Oliveira *et al.*, 2000), en el cv. venezolano Tempranita (99,11%) (Sánchez, 1991) y en el cv. EC118 donde obtuvieron altos porcentajes de supervivencia (96-100%), independientemente del sustrato utilizado (Cavallero *et al.*, 2012). Zimmerman *et al.* (2007) también informaron valores de supervivencia mayores al 95%, al aclimatizar plantas de mandioca enraizadas *in vitro* en vermiculita, disminuyendo de este modo los daños que se producen en las raíces durante la remoción del agente gelificante. Por el contrario, Marín *et al.* (2008) registraron una sobrevida de plantas del 57,5% al 0%, Broomes y Lacon (1995) obtuvieron una sobrevida de 82% al finalizar la primera semana de aclimatización de plantas *in vitro* derivadas de medio líquido y Azcon Aguilar *et al.* (1997) sólo lograron 75% de supervivencia inoculando plantas de mandioca con *Glomus desserticola* a pesar de la

expectativa de optimización que tuvieron con la aplicación de esta práctica. La mortandad de vitroplantas en esta etapa es un factor de alto riesgo si no se tienen establecidas las condiciones adecuadas para este proceso de adaptación y el estrés puede afectar en pocas horas la supervivencia del individuo (Reigosa *et al.*, 2004). Pérez (1998) afirma que hay grandes pérdidas de plántulas cuando no existe un área con las condiciones necesarias para una correcta aclimatización; debe existir un control estricto de los factores ambientales, prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones (Ziv, 1991; Haggman *et al.*, 1999; Sánchez, 2000). Ramírez *et al.* (1999) señalan que lo más importante de la aclimatización es garantizar que las plantas que se extraen del ambiente controlado no mueran, es decir, alcanzar altos porcentajes de supervivencia. Por ello, resulta imprescindible evitar la exposición a temperaturas extremas, establecer la temperatura ambiente entre los 25-30 °C durante la estación estival, mientras que en la época invernal por encima de los 18-20 °C (Mroginski *et al.*, 2010). El control de la intensidad de la luz en esta fase es también importante ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad baja, por lo tanto ésta se debe regular para evitar la foto inhibición y foto oxidación del aparato fotosintético (Agramonte *et al.*, 1998). Nutman (1973) hizo referencia a que los excesos de iluminación solar tenían efectos negativos sobre la fotosíntesis y la tasa de asimilación neta y que ambas podían mejorar regulando la luminosidad. Jiménez Terry *et al.* (2001) obtuvieron los mejores resultados de supervivencia cuando la iluminación fue menor de 75% en la primera semana de transplante de las plantas *in vitro*; ellos sugieren regular la intensidad de la iluminación durante la primera semana a 25 ó 50% e incrementar la misma al 50 ó 75% en la segunda semana. Por otra parte, es importante tener en cuenta que si bien hubo diferencias de supervivencia en función de las variaciones de iluminación, las mismas no ocasionaron diferencias significativas en el número de hojas y entrenudos. Numerosos autores se han referido a la necesidad de una alta humedad relativa durante la fase de aclimatación de vitroplantas, tanto herbáceas como leñosas, sobre todo para evitar el exceso de la transpiración, hasta que logren un adecuado desarrollo de los estomas, la cutícula y el sistema radical (Ziv, 1991); sin embargo, casi ninguno ha realizado un análisis profundo acerca de las características del régimen de riego necesario ni al período que deben permanecer las vitroplantas en esas condiciones.

La eficiencia del proceso de adaptación depende, entre otros factores, de la elección del sistema de transplante (cultivo en sustrato sólido o líquido), la selección del sustrato y de la obtención de una relación balanceada entre los componentes de la mezcla, que asegure una buena supervivencia (Díaz *et al.*, 2004). Dicho material deberá permitir la formación de un pan de sustrato con una buena estructura. Se trata de materiales sólidos y porosos, de origen natural o sintético, que solos o en mezclas, permiten un crecimiento adecuado de las plantas en condiciones controladas (Abad, 1989). Dependiendo de la composición química de los sustratos se conseguirá un crecimiento rápido y vigoroso de las plantas *in vitro*, que conduzca a obtener una planta de excelente calidad fisiológica en la fase de aclimatización lo cual será muy favorable para realizar el trasplante a condiciones de campo (Agramonte, 2000). En relación a esto, Da Silva *et al.* (1995) no encontraron diferencias significativas en la supervivencia, el área foliar y el número de nudos al utilizar diferentes sustratos en la aclimatización de plantas de mandioca. Cavallero *et al.* (2012), también observaron que la supervivencia de plantas de mandioca *in vitro* aclimatizadas en cámara de cultivo utilizando diferentes métodos de rustificación (transplante a sustrato sólido o líquido) y distintos sustratos (perlita, arena más lombricomposto, sustrato comercial Dynamics®, hidropónia en agua corriente o en solución nutritiva de Arnon y Hoagland, 1940), no difirió entre tratamientos siendo elevada en todos ellos (96% al 100%). Sin embargo, estos autores vieron que la supervivencia a campo se vio afectada por distintas características biométricas de las plantas transferidas al suelo, siendo superior la sobrevida en las plantas aclimatizadas previamente en

sustrato comercial o en hidroponia con solución nutritiva. En correlación con estos hallazgos, los excelentes resultados registrados en esta tesina en la sobrevivencia *ex vitro* incluso en el testigo, hacen pensar que el sustrato comercial utilizado para la transferencia de las plantas fue ideal por ser equilibrado y con una buena dotación de nutrientes asegurando así una alta supervivencia, independientemente de la dosis del bioestimulante ensayado.

Se sugiere que en el presente estudio la supervivencia fue alta en los diferentes tratamientos incluido el testigo, merced a la buena calidad de las plantas obtenidas *in vitro*, a una aclimatización gradual inicialmente transcurrida en una cámara climatizada y también debido al uso de un sustrato comercial enriquecido.

Otro factor que podría interferir en la supervivencia *ex vitro* durante la aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro* es la edad de las mismas al momento de transferirlas al ambiente externo (Palee *et al.*, 2012).

En este estudio se observó que independientemente del genotipo y de las edades de las plantas *in vitro* (30, 45 y 60 días) a ser aclimatizadas, la supervivencia de las plantas de mandioca evaluadas a los 7, 14 y 21 días de aclimatización en cámara de cultivo y a los 7 días de ser transferidas a condiciones ambientales externas (28 días totales de aclimatización) fue exitosa, ya que se registraron valores promedios del 89 al 100% de supervivencia. Palee *et al.* (2012) informaron que la supervivencia *ex vitro* de *Stemona curtisii* Hook.f. varió con la edad de las plantas al momento de ser transferidas al suelo para su aclimatización, siendo ideal el empleo de plantas *in vitro* de 30 y 60 días. Estos autores justifican el éxito de las plantas de 30 y 60 días en la aclimatización debido a su menor número de hojas al momento del transplante con respecto a plantas de 90 días, evitándole una mayor deshidratación que podía resultar letal. Da Silva *et al.* (1995) estudiando el efecto de las edades de las raíces emergidas *in vitro*, sustratos y especies sobre la aclimatización *ex vitro* en invernadero de palo santo (*Kielmeyera coreacea*), mandioca (*Manihot esculenta*), batata (*Ipomoea batatas*) y frambuesa (*Rubus idaeus*), en 3 edades (0-3, 7-10 y 15-18 días post-enraizamiento) y 4 sustratos (mezcla del subsuelo: latosol rojo con textura muy arcillosa, más arena y estiércol de corral; compostaje orgánico; compost orgánico comercial y vermiculita), observaron que la sobrevivencia estuvo ligada al genotipo y no fue influenciada por los sustratos ni las edades de enraizamiento. En papa, se obtuvo una supervivencia superior cuando las plantas *in vitro* tenían un mayor tamaño al momento de ser transferidas *ex vitro*, siendo mayor al emplear plantas de 4 cm vs. 2 a 4 cm y menor a 2 cm (Pérez, 1998).

Los resultados obtenidos en esta tesina indican que el genotipo influyó significativamente sobre algunos parámetros de crecimiento de las plantas de mandioca aclimatizadas *ex vitro*. Este efecto pronunciado del genotipo sobre el crecimiento de las plantas derivadas de condiciones *in vitro* (altura de plantas, número de nudos y longitud de raíces) coincide con lo observado por Roca (1983), Albarrán *et al.* (2003) y Marín *et al.* (2008). Similares resultados fueron obtenidos por Páez (1989), Litz y Jarret (1991).

Por otra parte, si bien Da Silva *et al.* (1995) no hallaron diferencias significativas en la supervivencia, el área foliar y el número de nudos al utilizar distintos sustratos en la aclimatización de plantas de mandioca como ya se había mencionado, si observó que el genotipo de las plantas *in vitro* afecta el número de hojas y área foliar de las plantas aclimatizadas y que la edad inicial de las mismas influye significativamente sobre su área foliar. Cavallero *et al.* (2012) no observaron diferencias significativas en la supervivencia de plantas de mandioca en cámara de cultivo en relación a los diferentes métodos de rustificación y distintos sustratos utilizados, pero si las hallaron en las variables área foliar, peso fresco y seco de raíces, tallos y hojas, peso total y biomasa radical, condición que influyó en la respuesta en condiciones de campo, donde la supervivencia fue elevada en las plantas

aclimatizadas en sustrato comercial y en hidroponia con solución nutritiva, presentando los mayores valores de peso fresco total y de raíces, mayor partición de biomasa a raíces tuberosas, mayor producción y rendimiento de raíces tuberosas. Es probable que el mayor desarrollo radical en esos tratamientos haya favorecido una mayor exploración del suelo, permitiendo una mejor absorción de agua y nutrientes en las condiciones de campo, con respecto al resto de los tratamientos y al control. Pérez (1998) trabajando con papa, observó que plantas de 4 cm sometidas a la aclimatización lograban la mayor supervivencia, el mayor número de nudos y la mayor longitud del tallo con respecto a plantas *in vitro* más pequeñas.

Con referencia al bioestimulante Inicum®, el mismo es comercializado en el mercado como un producto natural compuesto por péptidos de bajo peso molecular con gran actividad radicular y desarrollado especialmente para superar el estrés al transplante (Botta *et al.*, 2009). En este trabajo queda demostrado que la aplicación de Inicum® produce mejores respuestas que el testigo sólo en algunas variables y que en algunos casos interacciona con el genotipo, dependiendo también del tiempo de aclimatización. Además de registrarse diferencias estadísticas PF y PS de de raíces, lo notable es que se evidenciaron principalmente también diferencias en variables aéreas (ie. número de hojas totales, PF y PS de tallos y hojas y contenido relativo de clorofila medido con SPAD). En la variable PF de hojas además de observarse diferencias debidas al genotipo, se manifestaron diferencias significativas en favor de la menor dosis aplicada de Inicum® con respecto al testigo, siendo la que promovió un mayor peso. Por otra parte, el contenido relativo de clorofila registrado en el primer experimento, experimentó un aumento cuando se lo trató con Inicum®. Komarova *et al.* (2008) demostraron que existen transportadores en la membrana plasmática de células radiculares que permiten la adquisición de N orgánico en forma de péptidos pequeños. De esta manera, estos autores proveyeron evidencias de que era posible la adquisición de péptidos pequeños, así como ya se había demostrado la absorción aminoácidos, los cuales podrían ser considerados como una fuente importante de N para los vegetales. También demostraron que plántulas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaban el transportador de péptidos (35S:AtPTR5), aumentaban su crecimiento y su contenido de N cuando se las cultivaron en medios con dipéptidos Alanina-Alanina, Prolina-Alanina o su combinación como fuente de N (Komarova *et al.*, 2008). Por su parte, Rodríguez Mendoza *et al.* (1998), determinaron que existe un alto coeficiente de regresión entre el contenido relativo de clorofila medido con SPAD, el contenido de clorofila extractable y el contenido de N total, por lo que aumentos del contenido de clorofila y peso de órganos aéreos podrían relacionarse a un mayor contenido de N en la planta como consecuencia de la fertilización con Inicum®.

En el segundo experimento, donde las plantas fueron sometidas a una misma dosis del bioestimulante, el contenido relativo de clorofila medido con SPAD varió con el genotipo manteniéndose constante con respecto a la edad de la planta *in vitro* a aclimatizar. Evidentemente el factor edad de la planta a aclimatizar no ejercería un efecto significativo sobre el contenido relativo de clorofila a diferencia del genotipo que influyó notablemente sobre distintas variables biométricas.

Si bien hubo variaciones del contenido relativo de clorofila en el tiempo, al final de la aclimatización de las plantas sometidas a distintas dosis de Inicum arribaron a valores similares a la planta *in vitro*. Por otra parte, las plantas de 45 días de edad a los 28 días de su aclimatización presentaron valores más altos de contenido relativo de clorofila con respecto a la planta inicial *in vitro*.

El estudio de los pigmentos es importante desde el punto de vista fisiológico ya que aporta información sobre los cambios que puede sufrir un individuo durante su vida, cuando atraviesa eventos de estrés y las consecuencias sobre su productividad. Las alteraciones en la composición de pigmentos fotosintéticos pueden estar relacionados con la fotoaclimatación (Richardson *et al.*, 2002). Cuando se evaluó el efecto de diferentes fertilizantes y sustratos en el

contenido de clorofila y N de plantas transplantadas de tomate no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí entre fechas de muestreo; los valores más altos de clorofila medidos con SPAD y de N se presentaron en plantas a los 45 días después del transplante, los cuales fueron disminuyendo conforme se desarrolló el cultivo (Rodríguez *et al.*, 1998). Según Wilcox (1994) conforme transcurren los días después del transplante y se desarrolla la planta, el contenido de N en las hojas (el cual se relaciona altamente con el contenido de clorofila) disminuye para incrementarse en la planta completa.

El bioestimulante Inicium® también ha sido desarrollado para disminuir o evitar el estrés que pueden sufrir las plantas cuando se las exponen a factores abióticos (clima, suelo, manejo del cultivo) y bióticos (plagas y patógenos) que influyen perjudicialmente en su desarrollo. Frente a una situación de estrés, las plantas activan la expresión de proteínas de estrés que tienen como función proteger a las células (Ruz *et al.*, 2004). Fue así que distintos investigadores condujeron sus estudios hacia la búsqueda de soluciones para los distintos tipos de estrés de las plantas mediante el aporte exógeno de aminoácidos libres y péptidos de muy bajo peso molecular que sean absorbidos directamente por el vegetal vía foliar y/o radicular sin necesidad de mineralización previa, ahorrándose así una serie de procesos metabólicos que consumen mayor energía (Gomis *et al.*, 1987; Botta *et al.*, 2009). Por otra parte, se demostró que estos péptidos inducen al individuo a sintetizar proteínas de defensa (PR- 2 glucanasa y PR- 3 quitinasa) (Botta *et al.*, 2008; Botta *et al.*, 2009) y que sus aminoácidos derivados colaboran en otros procesos metabólicos, que son de importancia vital para la sobrevivencia de plantas transplantadas (Buhl y Stewart, 1983; Gomis *et al.*, 1987). La aplicación de Inicium® también aumentó la precocidad de la floración, el número de flores y la producción en las parcelas tratadas en fresa y en plantines de tomate para industria propició un mayor desarrollo radicular, mayor materia seca y mayor capacidad para soportar el transplante (Botta *et al.*, 2008).

Es probable que el cuidado propiciado a las plantas de mandioca, la gradualidad del proceso de transferencia y la composición del sustrato comercial utilizado para la aclimatización empleado en esta tesina, satisfizo adecuadamente las necesidades de las plantas, brindándole calidad física y química capaz de sostener y promover el crecimiento de las plantas transplantadas, incluso en el tratamiento testigo, no permitiendo demostrar mayores beneficios en el crecimiento como consecuencia de la aplicación de Inicium®. Quizás el uso de un sustrato empobrecido haya podido maximizar las diferencias entre el testigo y los tratamientos con aplicación exógena de bioestimulante, reafirmando su reconocida capacidad activadora del crecimiento radical en todos los genotipos evaluados.

Con respecto a la edad de las plantas a ser trasferidas *ex vitro*, a pesar de que las plantas *in vitro* de mandioca de 45 y 60 días fueron las que mostraron una mayor pérdida de hojas por deshidratación y abscisión, aparentemente este hecho no incidió negativamente en su aclimatización, independientemente del genotipo. En *Stemona curtisii* se observó que las plantas sobrevivientes a la aclimatización formaron raíces y hojas nuevas, y que las hojas *in vitro* se deshidrataban, marchitaban y morían, lo cual se tornaba negativo cuando las plantas *in vitro* a aclimatizar eran de 90 días de edad y tenían numerosas hojas por planta (ca. 10 hojas) (Palee *et al.*, 2012). Si bien se ha sugerido que las hojas *in vitro* son muy sensibles a la pérdida de agua y como consecuencia su deshidratación pone en riesgo la supervivencia de las plantas en aclimatización (Lavanya *et al.*, 2009), en este trabajo las plantas *in vitro* de mandioca de 45 y 60 de edad a pesar de ser las de mayor cantidad de hojas iniciales y las que sufrieron las mayores pérdidas de hojas no evidenciaron la letalidad esperada, si no al contrario demostraron una muy alta supervivencia (90-100%).

Independientemente del genotipo, cuando se comparó las plantas aclimatizadas *ex vitro* vs. las plantas *in vitro* recién removidas del tubo se observó que las variables altura de plantas, número de nudos, hojas secas, hojas totales por planta, contenido relativo de clorofila (sólo en el 2do. experimento), PF y PS de tallo y hojas y el área foliar fueron mayores al final de la

aclimatización. En el PF y PS de raíces se observaron diferencias entre plantas *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro* sólo en los cvs. Rocha y Bl. de Sta. Catarina. En relación a esto, la altura de plantas, el número de nudos y el número de hojas totales aumentó pero no llegó a duplicarse en todos los casos, sin embargo el número de hojas secas se duplicó y el área foliar se cuadriplicó, pasando de 5-10 cm² a 50-90 cm². En relación a esto, el número de hojas totales varió poco con el paso del tiempo, pero si se analiza el peso de hojas *in vitro* vs. *ex vitro* se cuadriplicó, como consecuencia del crecimiento de las hojas (por aumento del área foliar) y no tanto por la generación de nuevas hojas. Por otra parte, el PF y PS de tallos se duplicó, el PF y PS de raíces se duplicó dependiendo del genotipo y PF y PS de hojas se triplicó o más.

Cuando la transferencia *ex vitro* fue exitosa, el aumento de su crecimiento puede ser enorme, como se ha visto en plantas aclimatizadas de *Nicotiana tabacum* las cuales manifestaron un aumento en altura, área foliar, número de hojas, masa seca total y por órganos varias veces mayor que los valores iniciales registrados en plantas *in vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1989; Kadlecek, 1997; Kadlecek *et al.*, 1998). A pesar de que en muchas especies se ha observado que las hojas formadas *in vitro* no son capaces de seguir desarrollándose en condiciones *ex vitro* y son sustituidas por hojas nuevas (Preece y Sutter, 1991; Dietrich *et al.*, 1992), en esta tesis se ha visto que si bien hay un aumento en el número de hojas de las plantas de mandioca aclimatizadas *ex vitro*, la superficie fotosintética es principalmente aumentada por el incremento del área foliar.

Independientemente de las diferencias genotípicas, el crecimiento en longitud del tallo y la formación y retención de las hojas y la ganancia de peso respecto a la condición inicial registradas en esta tesis, demuestran una significativa actividad y diferenciación de los tejidos meristemáticos y órganos de las vitroplantas en aclimatización, de acuerdo a los señalado en Fajardo *et al.* (2011). Cavallero *et al.* (2012), informaron que la altura de plantas, el número de nudos, el área foliar, el peso fresco y seco total y su materia seca post-aclimatización se incrementaron significativamente cuando se usó para su aclimatización solución nutritiva de Arnon y Hoagland (1940) o sustrato comercial Dynamics® con respecto a la condición inicial de las plantas *in vitro*. Este importante aumento en la biomasa de las plantas de mandioca aclimatizadas concuerda con lo hallado por Pospíšilová *et al.* (1999) en *Nicotiana tabacum*, quienes sostienen que si el transplante a las condiciones *ex vitro* resulta satisfactorio, el incremento en el crecimiento a campo puede ser sumamente mayor. En este sentido, también se ha demostrado que el rendimiento de las plantas *in vitro* de mandioca cv. EC118, aclimatizadas en solución nutritiva o en sustrato comercial Dynamics® se ha favorecido, aumentando un 61% y 57%, respectivamente, comparado con el rendimiento alcanzado por las plantas control derivadas del cultivo convencional de estacas caulinares.

El establecimiento de un protocolo de aclimatización *ex vitro* que asegure la supervivencia y el crecimiento de plantas regeneradas *in vitro* de mandioca de genotipos diversos, sigue siendo un aspecto vital para optimizar la propagación de esta especie y lograr la calidad biológica requerida para su adaptación post-transplante a condiciones de campo y su buen desempeño en términos agronómicos.

Conclusión:

- La aplicación de un activador del crecimiento radical y la edad de las plantas *in vitro* al momento del transplante no afectan la supervivencia de las plantas *in vitro* transferidas *ex vitro*, pero si influyen en algunas variables de crecimiento de plantas de diferentes cultivares de mandioca.
- De acuerdo a estos resultados, el producto Inicium® a pesar de comercializarse principalmente como un bioestimulante activador del crecimiento radical, tuvo además un impacto positivo sobre parámetros de crecimiento aéreo, manifestándose una influencia genotípica destacada.
- La edad ideal de las plantas *in vitro* de mandioca para someter a la aclimatización se considera que es la de 45 días, independientemente del genotipo, dado que brinda un mayor tasa de multiplicación y mayor peso del tallo respecto de las plantas de 30 días, acortando el tiempo de obtención de plantas útiles para el campo en comparación con las plantas de 60 días.
- Para obtener las mejores respuestas en la aclimatización *ex vitro* de plantas de mandioca, se recomienda emplear plantas *in vitro* de 45 días de edad y la aplicación de 22,7 ml de una solución de Inicium® al 0,6 % v/v.

Bibliografía:

- **Abad, M. 1989.** Los sustratos en horticultura ornamental. Revista Agrícola Vergel 3:146-152.
- **Agramonte, D. 2000.** Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum L.*) var. Désirée. Tesis de Doctorado. IBP Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba.
- **Agramonte Peñalver, D.; F. Jiménez Terry; M. A. Dita Rodríguez. 1998.** Aclimatización. En: Pérez Ponce, J. N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Sta. Clara, Villa Clara. Cuba, pp. 193-206.
- **Albarrán, J.; F. Fuenmayor; M. Fuchs. 2003.** Propagación *in vitro* de clones seleccionados de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pertenecientes al Banco de Germoplasma del INIA-CE- NIAP. Red de Biotecnología Agroalimentaria, Encuentro Nacional. Memorias.
- **Alves, A. A. C. 2002.** Cassava Botany and Physiology. En: Hillocks, R.J.; J.M. Tresh y A.C. Bellotti (Eds.), Cassava Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, Oxon, New York, pp. 67-89.
- **Amar, S.; L. E. P. Pérez y G. B Kerbauy. 1995.** Análisis comparativo del contenido de ceras en hojas de *Catasetum fimbriatum* (Morres Lindi) *in vitro* y *ex vitro*. En: Congreso Nacional de Botánica, 44, Ribeirão Preto. Anais Ribeirão Preto, pp. 267-268.
- **Arnon, D. I. y D. R. Hoagland. 1940.** Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. Soil Science 50: 463-83.
- **Azcón Aguilar, C.; M. Cantos; A. Troncoso y J. M. Barea. 1997.** Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropagated cassava plantlets. Scientia Horticulturae 72: 63-71.
- **Botta, A.; L. Ruz; C. Marín; N. Sierras; M. Carrión; E. Badosa; E. Montesinos y R. Piñol. 2008.** Estudio del modo de actuación de Inicium®, un producto desarrollado específicamente para superar el estrés del trasplante en la planta de la fresa. VI Simposium Internacional de la Fresa. Huelva, España.
- **Botta, A.; C. Marín; R. Piñol; L. Ruz; E. Badosa y E. Montesinos. 2009.** Study of the mode of action of Inicium®, a product developed specifically to overcome transplant stress in strawberry plants. Acta Horticulturae 842: 721-724.

- **Bromees, V. F. y R. Lacon.** 1995. Influence of medium components on hardening of cassava after micropagation in liquid nutrient medium. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, pp. 210-219.
- **Buddendorf-Joosten, J. M. C. y E. J. Woltering.** 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. Plant Growth Regulation 15: 1-16.
- **Buhl, M.B. y C.R. Stewart.** 1983. Effects of ClNa on proline synthesis and utilization in excised barley leaves. Plant Physiology 72 (3): 664-667.
- **Cañete, M.; R. Kosciak; A. Burgos; R. Medina y P. Cenóz.** 2012. Efecto del sombreadamiento y de la aplicación de un iniciador de la actividad radicular sobre el crecimiento de plantines de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). En: 23^{ra}. Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, FCA-UNNE. Corrientes Argentina. <http://agr.unne.edu.ar/Extension/Res2012/index.htm>
- **Ceballos, H.** 2002. La yuca en Colombia y el mundo: Nuevas perspectivas para un cultivo milenario. En: Ospina B., Ceballos H. (Eds.), La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Cali, Colombia, pp. 1-13.
- **Cavallero, M. I.; R. D. Medina (ex aequo); R. E. Hoyos; P. J. Cenóz y L. A. Mroginski.** 2012. Chapter 3: Biotechnology applied to cassava propagation in Argentina. En: Colleen M. Pace (Eds.), Cassava: Farming, Uses, and Economic Impact. Nova Science Publishers, New York, EE.UU, pp. 55-77.
- **Cock, J. H.** 1989. La yuca, nuevo potencial para un cultivo tradicional. Boulder, Colorado, USA. Westview Press, p. 240.
- **Da Silva, A. T.; M. Pasqual; J. S. Ishida y L. E. C. Antunes.** 1995. Aclimatação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 30: 49-53.
- **Desjardins, Y.** 1995. Photosynthesis *in vitro* on the factors regulating CO₂ assimilation in micropagation systems. Acta Horticulturae 393: 45-61.
- **De Bernardi, L.** 2011. Cadenas alimentarias: Mandioca. Alimentos Argentinos 51: 49-52.
- **Díaz, L. P.; L. F. Medina; J. Latife; P. A. Digonzelli; S. B. Sosa.** 2004. Aclimatación de plantas micropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. Revista de Investigaciones Agropecuarias 33 (2): 115-128.
- **Dietrich, B.; H. Mertinat y M. Luckner.** 1992. Reduction of water loss during *ex vitro* acclimatization of micropagated *Digitalis lanata* clone plants. Biochemical Physiological Pflanzen 188: 23-31.
- **Diez, J. y L. Gil.** 1999. Culturing of cell tissues within the Spanish breeding programme against Dutch elm disease. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain, pp. 307-311.
- **Domínguez, C. E.; L. F. Ceballos y C. Fuentes.** 1983. Morfología de la planta de yuca. En: Domínguez, C.E. (Ed.), Yuca: investigación, producción y utilización. Programa de Yuca. PNUD/CIAT, Cali, Colombia, pp. 29-49.
- **Dufour, D.** 1996. Apoyo al sector almidonero de yuca en Colombia: Impacto del proyecto CIRAD/CIAT. En: Montaldo, A. (Ed.) La yuca frente al hambre del mundo tropical. UCV-CECOTUD-FEDEAGRO-Fondo de Crédito Agropecuario. Maracay, Venezuela, pp. 301-311.
- **El-Sharkawy, M. A.** 2003. Cassava biology and physiology. Plant Molecular Biology 53: 621-641.
- **Escobar, R. H.; C. M. Hernández; N. Larrahondo; G. Ospina; J. Restrepo; L. Muñoz; J. Tohme y W.M. Roca.** 2006. Tissue culture for farmers: participatory adaptation of low input cassava propagation in Colombia. Experimental Agriculture 42: 103-120.
- **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) FIDA (Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola).** 2000. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectivas. FAO – FIDA, Roma, Italia, pp. 59.
- **FAOSTAT (The Statistics Division of the FAO).** 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx> (Fecha de la consulta 25/10/2013).
- **Fajardo, R. L.; Blanco, B. Y.; Borges, G. M.; Fonseca, C. D.; Hernández, J. Y. y Arceo, E. L.** 2011.

Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf en el enraizamiento y aclimatización de *Dianthus caryophyllus*. Publicaciones Científicas. Revista Ciencias.com. (Fecha de la consulta 3/4/2016). <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EFEIppluZkfPDLJFIC.php>

- **Frampton, L. J.; H. V. Amerson y G. N Leach.** 1998. Tissue culture method affects *ex vitro*, growth and development of loblolly pine. *New Forests* 16: 125-138.
- **García Garibay, M.; R. Quintero Ramírez y A. López-Munguía Canales.** 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa S.A. México D.F, p. 636.
- **Gomis, P.; LL. Ávila; R. Ruhi y F.J. Vila-Pahi.** 1987. Fertilización a base de aminoácidos. *Fruticultura profesional* 12: 156-157.
- **Grattapaglia, D. y L. Machado.** 1990. Micropropagação. En: A.L. Torres y L. S. Caldas (Eds.), *Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Abctp/Embrapa, Brasil, pp. 99-170.
- **Haggman, H.; A. Jokela; J. Krajnakova; A. Kauppi; K. Niemi y T. Aronen.** 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany* 50: 1769-1778.
- **Henry, G.; A. Westby y C. Collinson.** 1998. Global cassava end-uses and markets: current situation and recommendations for further study. Reporte de la FAO consultancy por the European Group on Root, Tuber and Plantain. Centre de recherché agronomique pour le développement (CIRAD), Francia, p. 58.
- **Inoue, M.T.; J. D. Viera y G. Correa.** 1999. Estudio comparativo del desempeño fotosintético entre pasturas micropropagadas y de estacas de cuatro clones del híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. En: Congreso Forestal Braileño, G. Campos de Jordão. Anais, pp. 493-496.
- **Jiménez Terry, F. A.; D. Agramonte Peñalver; J. N. Pérez Ponce; D. Ramírez Aguilar; O. Gutiérrez Martínez y M. Pérez Peralta.** 2001. Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* (L.) variedad Desirée. *Biotecnología vegetal* 1 (2): 103-108.
- **Jorge, M. A.; A. I. Robertson; A. B. Mashingaidze y E. Keogh.** 2000. How *in vitro* light affects growth and survival of *ex vitro* cassava. *Annals of Applied Biology* 137: 311-319.
- **Kadleček, P.** 1997. Effect of pretreatment by irradiance and exogenous saccharose under *in vitro* conditions on photosynthesis and growth of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants during acclimatization after transfer to soil. Diploma Thesis, Charles University, Department of Plant Physiology, Praha. [In Czech].
- **Kadleček, P.; I Tichá; V. Čapková y C. Schäfer.** 1998. Acclimatization of micropropagated tobacco plantlets. En: Garab, G. (Ed.): *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Vol. V. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 3853-3856.
- **Komarova, N. Y., K. Thor, A. Gubler, S. Meier, D. Dietrich, A. Weichert, M. Suter Grottemeyer, M. Tegeder y D. Rentsch.** 2008. AtPTR1 and AtPTR5 transport dipeptides *in planta*. *Plant Physiology* 148 (2): 856-869.
- **Kozai, T.** 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. En: Debergh, P., Zimmerman, R. (Eds.), *Micropropagation technology and application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp 447-469
- **Kozai, T. y M. A. L. Smith.** 1995. Environmental control in plant tissue culture - general introduction and overview. En: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.L. (Ed.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 301-318.
- **Krugh, B.; L. Bichham y D. Miles.** 1994. The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 68: 25-27.
- **Lavanya, M.; B. Venkateshwarlu y B. Devi.** 2009. Acclimatization of neem microshoots adaptable to semi-sterile conditions. *Indian Journal of Biotechnology* 8: 218-222.
- **León, J.** 2000. Botánica de los cultivos tropicales. Agroamérica del IICA, San José, Costa Rica, p. 517.

- Li, H. Q.; J. Y. Guo; Y. W. Huang; C. Y. Liang; H. X. Liu; I. Potrykus y J. Puonti-Kaerlas. 1998. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 410-414.
- Litz, R. y R. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca W, Mroginski L (Eds.) *Cultivo de tejidos en la agricultura*. CIAT, Cali, Colombia, pp. 143-172.
- López, J. 2002. Semilla vegetativa de yuca. En: Ospina, B. y H. Ceballos (Eds.), *La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT, Cali, Colombia, pp. 49-75.
- Luya, U. 1999. Micropropagación *in vitro* y aclimatación de Marigold (*Tagetes erecta*). Tesis para optar el título de Biólogo, Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Marín, A.; D. Perdomo; J. G. Albarrán; F. Fuenmayor y C. Zambrano. 2008. Evaluación agronómica, morfológica y bioquímica de clones élitres de yuca a partir de vitroplantas. *Interciencia* 33: 365-371.
- Medina, D.; M. M. Faloci; V. Solís Neffa y L. A. Mroginski. 2003. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 32: 143-160.
- Montaldo, A.; T. Gunz; J. J. Montilla; S. Pérez Alemán y A. E. Reverón. 1979. La yuca o mandioca (*Manihot esculenta*). San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, p. 386.
- Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca, W.M. y L.A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Cali, Colombia, pp. 1-17.
- Mroginski, L. A. y A. M. Scocchi. 1993. Somatic embryogenesis of Argentine cassava varieties. En: W. M. Roca y A. M. Thro (Eds.), *Proceedings of First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*. CIAT, Cartagena de Indias, Colombia, pp. 175-179.
- Mroginski, L. A.; P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA, Argen Bio, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, pp.17-25.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Mussio, I.; M. H. Chaput; I. Serraf; G. Ducreux y D. Sihachakr. 1998. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 205-211.
- Nutman, J. F. 1973. Studies on physiology of coffee leaves under natural conditions. *Annals of Botany* 1: 353-357.
- Olsen, K. M. y B. A. Schaal. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88: 131-142.
- Páez, J. 1989. Propagación *in vitro* de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista de la Facultad de Agronomía (Universidad de Zulia)* 38: 139-146.
- Palee, J.; S. Dheeranupattana; A. Jatisatienr; S. Wangkarn; P. Mungkornasawakul; S. Pyne y T. Sastraruji. 2012. Influence of plantlet age and different soilless culture on acclimatization of *Stemona curtisiae* Hok. *F. Asian Journal of Plant Sciences* 11: 294-299.
- Pedroso de Oliveira, R.; T. Da Silva Gomes y A. Duarte Vilarinhos. 2000. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 2329-2334.
- Pérez, J. N. 1998. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez, J.N. (Ed.), *Propagación y mejora de plantas por biotecnología*. IBP, Santa Clara, Cuba, pp. 179-191.
- Pila, L. A. y J. Benítez. 2007. Sistema autotrófico hidropónico (SAH): Una alternativa para la

producción de plántulas de yuca de calidad. INIAP. Estación Experimental Santa Catalina EC. http://www.clayuca.org/clayucanet/edicion11/sah_pila.pdf (Fecha de consulta 31/10/2013).

- **Pospíšilová, J.; J. Čatský y Z. Šesták. 1997.** Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. En: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, pp. 525-540.
- **Pospíšilová, J.; J. Solárová y J. Čatský. 1992.** Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica* 26: 3-18.
- **Pospíšilová, J.; H. Synková; D. Haisel; J. Čatský; N. Wilhelmová y F. Šrámek. 1999.** Effect of elevated CO₂ concentration on acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Journal of Experimental Botany* 50: 119-126.
- **Pospíšilová, J.; I. Tichá; J. Čatský; J. Solárová y M. Ondřej. 1989.** Photosynthesis in regenerants of tobacco transformed by plasmids of *Agrobacterium*. 3. Transplanted plants. *Photosynthetica* 23: 130-135.
- **Pospíšilová, J.; I. Tichá; P. Kadlec; D. Haisel y Š. Plzáková. 1999.** Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.
- **Preece, J. E. y E. G. Sutter. 1991.** Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. En: Debergh P.C., Zimmerman, R.H. (Eds.), *Micropropagation technology and application*. Editorial Dordrecht Kluwer Academic Press, pp. 71-93.
- **PRODECA (Promotora de capitales). 2005.** Estudio de mercado de la yuca y sus derivados en Venezuela. www.infocentro.gob.ve/viewusuario/docs/laYucaysusDerivadosenVzla (Fecha de consulta 28/06/2016).
- **Raemakers, C. J.; J. J. Bessembinder; G. Staritsky; E. Jacobsen y R. G. F. Visser. 1993.** Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 151-156.
- **Ramírez, D.; F. Jiménez y D. Agramante. 1999.** Acción de microorganismos en la aclimatación de vitroplantas. En: Libro de reportes cortos. 5^{to}. Coloquio Internacional de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba, pp. 158-159.
- **Reeves, W. D.; P. L. Mask; C. W. Wood y .D. P. Delay. 1993.** Determination of wheat nitrogen status with a handheld chlorophyll meter. Influence of management practices. *Journal of Plant Nutrition* 16: 7781-7796.
- **Reigosa, M.; I. N. Pedro y A. Sánchez. 2004.** La Eco fisiología Vegetal una Ciencia de Síntesis: Cap. 34. Eco fisiología del cultivo *in vitro*: Aclimatación de plantas. Thomson Ed. España. : 1017-1053.
- **Richardson A, S. Duigan y G. Berlyn. 2002.** An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153, 185-194
- **Roca, W. M.; B. Nolt; G. Mafla; J. Roa y R. Reyes. 1991.** Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. CIAT, Cali, Colombia, p. 403-420.
- **Roca, W. 1983.** Cultivo de tejidos en yuca. En Domínguez C (Ed.), *Yuca: Investigación, Producción y Utilización*. Doc. Nº 50. CIAT. Cali, Colombia, pp. 153-163.
- **Rodríguez Mendoza, M. de las N.; G. A. González; A. Aguilar Santelises; J. D. Etchevers Barra y J. A. Santizó Rincón. 1998.** Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en el tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra* 16 (2): 135-141.
- **Rogers, D. J. y S. G. Appan. 1973.** *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae), a computer-assisted study. *Flora Neotropica*, Monograph 13, Hafner Press, New York, EE.UU, p. 272.
- **Ruz, L.; E. Badosa y E. Montesinos. 2004.** Las proteínas de estrés en las plantas. *Phytoma* 159: 49-51.
- **Sánchez, J. L. 1991.** Aclimatación en vivero y adaptación en el campo de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) multiplicadas a partir de ápices caulinares *in vitro*. Tesis de grado de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, p. 108.
- **Sánchez, O. 2000.** Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de

Concepción, Chile, p. 322.

- **Segovia, R. J.; A. Bedoya; W. Triviño; H. Ceballos; G. Gálvez y B. Ospina. 2002.** Metodología para el endurecimiento masivo de vitroplantas de yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (Eds.), La yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Cali, Colombia, pp. 572-583.
- **Smith, M. K.; B. J. Biggs y K. J. Scott. 1986.** *In vitro propagation of cassava (Manihot esculenta* Crantz). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6: 221-228.
- **Texeira, J. B; J. I. Lemos y M. C. Coelhe. 1995.** Micropropagacão de espécies lenhosas da mata atlântica. En: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. 5 (Ed.), Lavras Anais, p. 132.
- **Wilcox, E. G. 1994.** Tomato. En: N.F. Bennett (Ed.). Nutrient deficiencies of toxicities in crop plants. APS Press. American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. USA, pp. 127-141.
- **Zimmerman, T. W.; K. Williams; L. Joseph; J. Wiltshire y J. A. Kowalski. 2007.** Rooting and acclimatization of cassava (*Manihot esculenta*) *ex vitro*. Acta Horticulturae 738: 735-740.
- **Ziv, M. 1991.** Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plant. En Debergh, P.C. Zimmerman, R.H. (Eds.), *Micropropagation: Technology and application*. Dordrecht. Kluwer Academic, pp. 49-69.