



**UNIVERSIDAD DE CIENFUEGOS**  
**“Carlos Rafael Rodríguez”**

“Escalado de la propagación *in vitro* de la yuca en la  
Biofábrica de Cienfuegos”

**Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo**

Autor: Juan Rolando García Torres

Tutores: Dr. C. Víctor R. Medero Vega  
MSc. Milagros Basail Pérez

Consultante: MSc. Marilyn Fontes Leandro

Cienfuegos  
2012

## **AGRADECIMIENTOS**

*Son una parte amorosa y necesaria quienes han contribuido a hacer realidad este sueño, son merecedores del mérito que significa este fruto y son principalmente los que hoy y siempre tendrán mi eterna gratitud.*

♠ *A mis tutores Dr. C. Víctor R. Medero Vega, MSc. Milagros Basail Pérez, y MSc. Marilyn Fontes Lorenzo porque con dedicación esmerada y talento han impulsado la idea hasta convertirla en obra.*

♠ *A mis familiares, hijas, esposa, nieto, hermanos y amigos que dieron aliento a mis pasos.*

♠ *A la técnica Anaylí Muñoz por haber encontrado en ellas siempre su apoyo en la realización de los experimentos.*

♠ *A todos mis compañeros del grupo por el empeño en este trabajo y la preocupación constante, especialmente a Jorge López, a Carmen Pons, a Kenia Cabrera, a Marlenis Torres, a Nery Montano, a Damicela Reynaldo, a la Doctora Ana Hernández Jáuregui, a Tania Hernández, a la Directora de la Biofábrica Annery Aguilera y a David Montano por la ayuda en los momentos precisos.*

♠ *A la Ingeniera María Oliva por su apoyo en la realización de los análisis estadísticos.*

♠ *A mi esposa e hijas por su gran apoyo brindado en la culminación del trabajo.*

♠ *A Aymé Rayas por su cooperación en la revisión de dichos resultados.*

♠ *A los trabajadores de Biotecnología Vegetal y del Integral Porcino No 1 porque han cooperado con voluntad, talento y paciencia en el resultado que hoy puedo entregar.*

*A Todos  
Muchas Gracias.*

## **DEDICATORIA**

*Si ustedes a mi sueño han dedicado lo mejor de sus vidas, entonces, todo lo bueno me hará recordarlos.*

*A la memoria de mis padres.*

*A mis hijas, esposa y nieto porque no hay obra perfecta sin amor.*

*A mis amistades porque alimentaron la esperanza con la miel de la razón.*

## **PENSAMIENTO**

*"... es largo y fatigoso el camino de ordenar nuestros campos, de introducir y aplicar la ciencia y la técnica y de resolver los grandes problemas que tenemos delante".*

*Fidel Castro Ruz*

## **RESUMEN**

La necesidad de producir material de plantación de alta calidad y rejuvenecidos fisiológicamente, disponibles para los productores de yuca ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación y por lo tanto la aplicación de las técnicas biotecnológicas. El presente trabajo se realizó en la Biofábrica de Cienfuegos y el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), durante el período comprendido entre enero del 2010 a febrero del 2012. El objetivo principal del trabajo consistió en evaluar, en condiciones de Biofábrica, la propagación de la yuca con énfasis en la aclimatización de vitroplantas para garantizar incrementos en los porcentajes de supervivencia. Se utilizaron los clones 'INIVIT Y 93-4', 'CEMSA 74-6329', 'CMC-40' y 'INIVIT Y 80+1' procedentes del banco de germoplasma del INIVIT. Como resultado se obtuvo la implementación de la micropropagación de la yuca a partir de 4 clones comerciales, donde se adquirieron los manejos y habilidades para obtener coeficientes de multiplicación de hasta 1:2,7 para el clon 'INIVIT Y 80+1' durante el séptimo subcultivo. A los seis días del subcultivo los explantes colocados en el medio esterilizado con G1 tomaron una coloración blanquecina, o sea comenzaron a perder clorofila. Además, en fase de aclimatización con el empleo del nuevo método de aclimatización mediante el uso del cobertor (cámara húmeda) se incrementó los porcentajes de supervivencia hasta el 87,51% con relación a un 75,79% cuando no se aplicó el cobertor (método tradicional). Finalmente, se recomienda consolidar la micropropagación de la yuca en la Biofábrica de Cienfuegos y aplicar estos resultados en otras entidades de su tipo.

Palabras clave: in vitro de la yuca, técnicas biotecnológica, Biofábrica de Cienfuegos banco de germoplasma del INIVIT.

ÍNDICE	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Sistemática .....	3
2.1.1. Origen .....	3
2.1.2. Taxonomía y Sinónimos .....	3
2.1.3. Morfología y Fisiología .....	4
2.2. Técnicas de cultivo de tejidos.....	5
2.2.1. Micropropagación .....	5
2.2.1.1. Organogénesis. Aspectos generales.....	5
2.2.1.2. Propagación <i>in vitro</i> vía organogénesis .....	6
2.2.1.2.1. Etapas o fases de desarrollo en la micropropagación <i>in vitro</i> .....	7
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> de la yuca.....	8
2.4. Propagación masiva en Biofábricas .....	10
2.5. Escalado de la Producción <i>in vitro</i> en Biofábricas.....	11
2.6. Aclimatización .....	12
2.6.1. Fisiología del cultivo <i>in vitro</i> que repercute directamente en la aclimatización .....	12
2.6.2. Técnicas de aclimatización .....	14
2.6.3. Instalaciones para la aclimatización.....	15
2.6.5. Manejo de las plantas en la aclimatización.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Material Vegetativo.....	17
3.2. Procedimientos generales .....	19
3.3. Evaluación de la micropropagación de los cuatro genotipos de yuca en la Biofábrica. ....	19
3.4. Aclimatización de las vitroplantas. Efecto del uso del cobertor. ....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
4.3. Evaluación de la micropropagación de los cuatro genotipos de yuca en la Biofábrica. ....	21
4.3.1. Efecto de la esterilización con G1 para la micropropagación .....	21

4.3.2. Evaluación de la micropropagación del clon 'CMC-40' durante seis subcultivos .....	23
4.3.3. Respuesta de cuatro cultivares de yuca al momento del trasplante a la fase de aclimatización .....	24
4.4. Aclimatización de las vitroplantas. Efecto del uso del cobertor. ....	27
5. CONCLUSIONES .....	33
6. RECOMENDACIONES .....	34
7. BIBLIOGRAFÍA .....	35

## 1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) forma parte del grupo de raíces y tubérculos que la población cubana denomina “Viandas”, la que ocupa un lugar muy importante en la preferencia para la alimentación humana y animal (Rodríguez, 1997).

Desde mediados de los años ochenta, la producción de yuca aumentó al mismo ritmo que en el decenio anterior, pero con la diferencia de que la expansión se basó en el aumento de la superficie plantada más que en el incremento de la productividad. Según las proyecciones de la FAO (2007), la producción nacional fue de 585 000 toneladas de raíces frescas y un rendimiento de 4.7 t.ha<sup>-1</sup>, el cual se encuentra por debajo del rendimiento promedio mundial (10.9 t.ha<sup>-1</sup>).

La yuca, existe en Cuba desde épocas precolombinas y por su elevado valor energético, destacada adaptabilidad a las diferentes condiciones edafoclimáticas y capacidad de producir bajo condiciones adversas bióticas y abióticas, cualidades poco común en otro cultivo, han motivado que a través de los años muestre un desarrollo ascendente no sólo en cuanto a áreas plantadas, sino también respecto a los rendimientos por área (Rodríguez *et al.*, 2000).

En la actualidad constituye un cultivo de gran importancia por su amplia utilización en la alimentación humana, animal y otros fines industriales; sin embargo, los rendimientos que se obtienen aún no satisfacen las necesidades crecientes de esta raíz tuberosa, motivado fundamentalmente entre otros factores por el clon comercial, la agrotecnia del cultivo y sobre todo por la calidad del material de plantación.

La necesidad de producir material de plantación de alta calidad y rejuvenecidos fisiológicamente, disponibles para los productores de yuca ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación y por lo tanto la aplicación de las técnicas biotecnológicas. Al respecto se han desarrollados protocolos para la propagación *in vitro* por organogénesis de este cultivo (Roca, 1984; Medero, 1995; Basail, 2001; Medero, 2006). Además, se han realizado trabajos de evaluación de la durabilidad del efecto de rejuvenecimiento y el incremento de los rendimientos.

En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) se trabaja en el proceso de producción de semilla original del cultivo de la yuca por técnicas Biotecnológicas desde hace varios años con resultados significativos y validados con participación del productor. Actualmente, toda la semilla básica que se produce en la institución es rejuvenecida por estas técnicas; sin embargo, no son suficientes las entregas para cubrir las demandas de las provincias en el establecimiento del Esquema de Producción de Semilla para este cultivo. Debido a lo anterior se hace necesario lograr la transferencia a la Biofábrica de Cienfuegos de la metodología de micropropagación de la yuca y lograr su adopción con porcentajes aceptables de sobrevivencia de las vitroplantas producidas a nivel de fase de aclimatización, con la siguiente Hipótesis de trabajo:

“Se podrá llevar a condiciones de Biofábrica la propagación *in vitro* de la yuca, así como crear condiciones de aclimatización que permitan la utilización de vitroplantas de este cultivo con porcentajes de sobrevivencia superiores a los alcanzados actualmente.

Para dar cumplimiento a la hipótesis formulada, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Evaluar, en condiciones de Biofábrica, la propagación de la yuca con énfasis en la aclimatización de vitroplantas que garantice incrementar los porcentajes de sobrevivencia.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar la metodología de micropropagación de la yuca en condiciones de Biofábrica a partir de 4 genotipos.
2. Estudiar la influencia de cobertores alternativos que permitan aumentar la supervivencia de los materiales propagados.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Sistemática

#### 2.1.1. Origen

La yuca es una de las principales plantas útiles tropicales difundidas en todos los continentes. Existen diversas opiniones acerca del centro de origen de esta especie y los investigadores se inclinan a admitir más de un lugar de origen, indicando como probables el Brasil, América Central y México. Sin embargo, la mayoría de los botánicos ecológicos consideran la yuca como una planta originaria de América tropical, y al nordeste de Brasil como el más probable centro de origen. La diversidad más amplia del género *Manihot* se encuentra en Brasil, suroccidente de México y Guatemala (Domínguez *et al.*, 1983).

#### 2.1.2. Taxonomía y Sinónimos

Reino: Vegetal

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledonae

Subclase: Anchi-chlamydae

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Manihot*

El género *Manihot* tiene más de 100 especies, incluyendo: *M. esculenta*, *M. utilissima* Pohl, *M. aipi* Pohl, *M. dulcis* Pax, *M. flexuosa* Pax et K. Hoffm., *M. flabellifolia* Pohl, *M. diffusa* Pohl, *M. melanobasis* Muell. Arg., *M. digitiformis* Pohl, *M. sprucei* Pax, etc. (Rogers, 1963) citado por Montaldo (1985).

Dependiendo de la zona geográfica donde se cultive o consuma, la yuca presenta diferentes nombres vulgares: Yuca (Bolivia, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, Santo Domingo, Salvador y Venezuela), Mandioca (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay), Guacamote (México), Manioc (Francia), Manioka (Alemania) y Cassava (EEUU), entre otros (Montaldo, 1991).

### 2.1.3. Morfología y Fisiología

La planta de yuca es un arbusto de tamaño variable, perenne, leñoso y de fotoperíodo corto. Se le puede encontrar entre los 30°N y 30°S, y de 0 a 2000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Es capaz de crecer en suelos pobres y ácidos, y en regiones secas; además es relativamente resistente a plagas y malezas, por lo cual es considerado como un cultivo rústico (Cock, 1989).

El tallo maduro es de forma cilíndrica, de ramificación simpodial y de color variable, según el cultivar. Los tallos cumplen una función fundamental en la reproducción vegetativa de la planta, al servir como "semilla" para su producción comercial. Las hojas son simples y alternas; tienen una gran riqueza proteica, y contienen tres y media veces más grasa y dos veces más fibra que las raíces (Montaldo, 1985). La lámina de la hoja es palmeada y posee varios folíolos. Las nervaduras pueden ser verdes, rojas o amarillas según la variedad, y el color del haz y del envés difiere. La inflorescencia puede ser una panícula, un racimo o una combinación de los dos. Las flores tienen 5 sépalos y 10 estambres, y el fruto es de 1 a 2 cm de diámetro, aristado, dehiscente y semicircular.

Las raíces en principio son fibrosas, pero tiempo después un porcentaje de estas se agranda, debido a la acumulación de almidón, denominándose tuberosas. Las raíces tuberosas de la yuca son morfológica y anatómicamente iguales a las raíces fibrosas; la diferencia radica en el cambio de la dirección del crecimiento, de longitudinal a radial, cuando se inicia la acumulación de almidones (Domínguez *et al.*, 1983).

La yuca es una planta monoica, aunque no todas las variedades florecen; las que lo hacen presentan protoginia, lo cual favorece la exogamia (Domínguez *et al.*, 1983), de ahí su alta heterocigocidad. Como la planta no presenta madurez fisiológica, la yuca se cosecha entre los 7 y los 24 meses de edad, dependiendo del clon, las condiciones ambientales y la demanda del producto, razón por la cual este cultivo debe considerarse de ciclo largo (Lozano *et al.*, 1977).

Esta especie se multiplica de tres formas: por semilla botánica; por pedazos de tallos o estacas, esta última comprende también el cultivo de tejidos, y por hojas, siendo la más utilizada la propagación por estacas (López *et al.*, 1984).

## **2.2. Técnicas de cultivo de tejidos**

### **2.2.1. Micropropagación**

Originalmente la micropropagación se definió como “cualquier” procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva (Villalobos y Thorpe, 1991).

#### **2.2.1.1. Organogénesis. Aspectos generales**

La organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el enraizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. En la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirectamente, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios favorecen el desarrollo de los brotes, la formación de raíces y viceversa (Jiménez, 1998).

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias

##### **1. Formación de yemas axilares.**

Se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados respectivamente (Hu y Wang, 1983). Este método ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y a la estabilidad genética de las plantas regeneradas,

siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética.

## 2. Formación de yemas adventicias

Esta técnica se basa en la formación de novo de yemas a partir de meristemos preexistentes o tejidos no meristemáticos, los cuales se originan de una o de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citoquininas (Vulysteke y de Langhe, 1985).

De esta forma es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización-automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de biorreactores para su producción (Akita *et al.*, 1994).

### **2.2.1.2. Propagación *in vitro* vía organogénesis**

Por sus ventajas constituye la tecnología más utilizada para la clonación de especies de interés económico. Es una tecnología relativamente simple, bien conocida, que se realiza a partir de la multiplicación de yemas, ápices o meristemos con más de dos décadas de experiencia, por lo que se ha designado con el término de “micropropagación convencional” (Orellana, 1998; Pérez *et al.*, 1998).

A escala comercial se han encontrado algunas desventajas que elevan los costos finales de las plantas, dentro de los cuales tenemos el gran número de operaciones manuales y su alto costo por mano de obra, el cual está comprendido entre el 80 y 90% del costo final de las plantas (Ziv, 1989) y entre un 50 y 80%, según Pérez *et al.* (2000). Otros aspectos lo constituyen el elevado gasto por energía eléctrica, el uso de agar como agente gelificante en el medio de cultivo y los frascos de capacidad limitada.

Además, esta técnica presenta restricciones desde el punto de vista biológico, ya que en la mayoría de las especies micropropagadas los coeficientes de multiplicación son bajos, lo cual también incrementa los costos de producción y disminuye la eficiencia en el proceso; siempre que sea considerada la eficiencia como el número de plantas generadas por unidad de tiempo (Villalobos y Thorpe, 1991; citados por Jiménez y De Fera, 1998). Razón por la cual Pérez *et al.* (1998),

señalan que la eficiencia del proceso está determinada por la fase de multiplicación y su parámetro fundamental es el coeficiente de multiplicación; indicando que por cada unidad de aumento en el mismo, disminuyen los costos en un 10%.

No obstante, a pesar de las limitaciones, la propagación vía organogénesis posee un gran número de ventajas; motivo por el cual un notable número de investigadores consideran que es posible su aplicación a escala comercial logrando hacerla más eficiente mediante la automatización, cambios tecnológicos, medidas organizativas y de control (Vasil, 1994; Pérez *et al.*, 1998). El aumento de la eficiencia en la micropropagación convencional está muy relacionada con el perfeccionamiento de las técnicas *in vitro* para incrementar los coeficientes de multiplicación y el volumen de material por área de cuarto de cultivo; y si es posible la automatización o semiautomatización de algunas etapas de la micropropagación, con énfasis en aquellas que mayor consumo de mano de obra implican (Orellana, 1998; Pérez *et al.*, 1998).

#### **2.2.1.2.1. Etapas o fases de desarrollo en la micropropagación *in vitro***

Según la experiencia, en la propagación comercial pueden identificarse bien definidas con sus objetivos específicos cinco etapas:

- Fase Preparatoria (0): Es importante, o casi indispensable, en el desarrollo de un esquema de micropropagación real y repetible, es una etapa preparativa donde se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y desarrollo posterior de los cultivos (Deberg, 1983).

Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético.

- Fase de establecimiento o iniciación de los cultivos (I): El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.

- Fase de multiplicación (II): Esta es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*, es en ella que se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad definiéndose no sólo

el número de plantas o propágulos a obtener, sino su calidad genética por ser esta fase en la que se producen las variantes somaclonales.

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes (meristemos apicales o axilares, yemas axilares o adventicias), ya establecidos *in vitro*.

- Fase de enraizamiento (III): Es la fase mas voluminosa de todo el proceso, pues en ella cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada *in vitro* para que, además de crecer y desarrollar un pseudotallo o tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una vitroplanta aclimatizada lista para llevarse a campo.
- Fase de aclimatización (IV): Es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta, dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso.

### **2.3. Cultivo *in vitro* de la yuca**

Los primeros reportes de la aplicación de técnicas biotecnológicas en el cultivo de la yuca se remiten a principios de la década del 70 y hasta la fecha se han logrado importantes avances, entre los cuales se pueden citar:

- Cultivo de callos

La formación de callos y la organogénesis en yuca fue reportada por Tilquin (1979) mediante el cultivo de entrenudos y observó la formación de protuberancias de color verde sobre los callos que se diferenciaban a estructuras similares a hojas. En estudios sobre el desarrollo de callos de yuca (Noerhadi y Widiyanto, 1982) utilizando diferentes auxinas y otros compuestos en el medio basal de Murashige y Skoog (1962), concluyeron que las auxinas y citoquininas son requeridas para el crecimiento de callos y la formación de raíces.

- Micropropagación y saneamiento

Mediante la propagación *in vitro* se puede evitar que los clones, ya probados respecto a la presencia de organismos patógenos, se contaminen de nuevo por acción de los insectos, el aire, el agua y otros organismos patógenos

transportados por el suelo (Roca *et al.*, 1991). La metodología de saneamiento de clones de yuca (Roca y Jayasinghe, 1982) consiste en un proceso de termoterapia seguido del cultivo de meristemas, que ha permitido realizar con éxito el saneamiento masivo de clones de yuca infectados o con sospechas de infección.

En la literatura aparece una serie de autores que vinculan la termoterapia, la quimioterapia y el cultivo de meristemas con el saneamiento de virus en el cultivo de la yuca (Kartha y Gamborg 1975; Gamborg y Kartha, 1976; Kartha y Gamborg 1979; Kaiser y Teemba, 1979; Roa, 1981; Mafla *et al.*, 1984; Nair, 1984; CIAT, 1985; Frison, 1987a; 1987b; Cohen, 1989; Nolt, 1990; Roca *et al.*, 1991).

- Micropropagación mediante cultivo de un solo nudo

La técnica más simple de micropropagación *in vitro* de la yuca es el cultivo de segmentos nodales obtenidos de plántulas derivadas de puntas meristemáticas. (Roca *et al.*, 1991).

La obtención de plantas a partir de meristemas apicales de yuca se logró sobre el medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con BAP, ANA y AG<sub>3</sub> (Kartha, 1975; Roca, 1979; 1980; Salazar, 1985; Zambrano, 1985). Bajaj (1978) reporta un método *in vitro* para la propagación clonal de plantas de yuca utilizando ápices meristemáticos como fuente de inóculo primario y el empleo de segmentos de brotes jóvenes con el propósito de multiplicar en gran escala sobre el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado por ANA (1,0 mg.L<sup>-1</sup>), Kinetina (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) y AG<sub>3</sub> (0,5 mg.L<sup>-1</sup>).

Una explicación detallada de la propagación clonal *in vitro* por cultivo de meristemas fue reportada por Roca (1979; 1980), quienes señalan la importancia de esta técnica como fundamento de la multiplicación acelerada de individuos libres de virus y otras enfermedades e insectos.

- Micropropagación mediante cultivo de brotes múltiples

Los requerimientos para lograr una multiplicación rápida de clones élites se pueden satisfacer mediante la inducción del cultivo de brotes múltiples o "roseta" iniciados con puntas meristemáticas (Roca, 1984). El método consiste en la adición de una dosis alta (1,0 - 5.0 mg.L<sup>-1</sup>) de 6-BAP que rompe la dominancia apical y da origen a un cultivo en "roseta", cuya transferencia a un medio libre de

6-BAP, pero enriquecido con  $AG_3$  promueve el crecimiento de yemas axilares que forman de 10 - 20 brotes por cultivo (Roca *et al.*, 1991).

Mireles y Páez (1984), lograron la inducción de "roseta" a partir de ápices caulinares de diferentes tamaños del clon 'UCV-2578', utilizando el medio de cultivo MS (1962) suplementado con Acido Naftalen Acético y 6-Bencilamino purina, y la formación de estas estructuras se observaron a la séptima semana de cultivo. Además, Páez (1989) con la finalidad de incrementar la tasa de multiplicación *in vitro* de la yuca realizó un estudio de seis medios de cultivo en estado sólido y líquido, utilizando combinaciones de hormonas y vitaminas, concluyendo que incluir como hormona sólo la 6-Bencilaminopurina en los medios de cultivo iniciales fue beneficioso para la mejor formación de las "rosetas" y el desarrollo de los brotes foliares.

- Micropropagación por embriogénesis somática

La primera información, hallada en la literatura, sobre embriogénesis somática en yuca fue realizada por Stamp y Henshaw (1982), utilizando pedazos de cotiledones de semillas maduras cultivados en un medio básico de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2,4D y 6-BAP. Estudios anatómicos y morfológicos (Stamp, 1987; Raemakers, 1993 y Konan *et al.*; 1994) demostraron que los embriones se desarrollaron de forma similar en semillas maduras y explantes foliares clonales de yuca. En Cuba, se puso a punto un protocolo para la obtención de embriones somáticos a partir de hojas inmaduras (Medero, 1995;), así como la obtención de embriones somáticos a partir de yemas axilares.

El objetivo final de la micropropagación es lograr el establecimiento en campo del material producido, teniendo en cuenta factores tan importantes como lo es el genotipo, el sustrato para el trasplante y el control de la humedad, temperatura y riego (Roca *et al.*, 1984; NG, 1985).

#### **2.4. Propagación masiva en Biofábricas**

En Cuba la propagación masiva de plantas comenzó a finales de la década del 70, con laboratorios que producían de 100 a 200 000 vitroplantas anuales de papa y paralelamente, los grandes centros científicos del país y las universidades comenzaron a desarrollar tecnologías, no solo de cultivo de tejidos sino también

de diagnóstico y saneamiento a los principales patógenos, así como para la identificación y caracterización de la variabilidad somaclonal. En 1987 se construye la primera Biofábrica del país (denominada como de Primera Generación) y entre 1987 y 1993, el número se elevó a 15 (Pérez *et al.*, 1998). En el momento actual el país dispone de un potencial instalado para producir 60 millones de vitroplantas al año con las tecnologías convencionales de propagación.

## **2.5. Escalado de la Producción *in vitro* en Biofábricas**

El desarrollo de la ciencia y la técnica no se concibe sin su implementación práctica en un sistema productivo y económicamente eficiente, esto último es vital para que los adelantos creados puedan dar solución a los problemas para los cuales fueron previstos; por otra parte los resultados de la ciencia aplicada deben responder a las actuales exigencias del mercado, donde hay un predominio de la competencia, por lo que es necesario ofertar productos de alta calidad y precios asequibles a los clientes. Sin embargo es reconocido que para ello, debe tenerse en cuenta estos aspectos desde la propia concepción y diseño de las investigaciones, hasta su instrumentación práctica a escala industrial o masiva y precisamente este enfoque sistémico se enmarca dentro del llamado Escalado de la Producción (Suárez y Alvarado, 1997).

Muchos autores reconocen que los procesos que se desarrollan a nivel de laboratorio no alcanzan los mismos resultados cuando aumenta el volumen, lo cual trae aparejado el fracaso y/o una demora excesiva en su aplicación a nivel industrial, con el consiguiente alargamiento del ciclo de vida de los productos. De lo anterior, deben esclarecerse dos conceptos muy importantes: el Escalado de la Producción y el Ciclo de Vida del Producto.

Viñas (1994) expresó al respecto, que el escalado se define como “el proceso necesario para alcanzar la producción industrial a partir de un logro científico a nivel de laboratorio”, mientras que el ciclo de vida de un producto no es más que “el tiempo que transcurre desde la concepción hasta su comercialización”; Morita (1992) confirma que éstos conceptos son de suma importancia para poder alcanzar la competitividad necesaria si tenemos en cuenta que los precios y

oportunidades en el mercado van variando en el tiempo, lo que implica la necesidad de minimizar el ciclo de vida de los productos. Un ejemplo clásico corresponde a la comercialización de plantas ornamentales, donde se reconoce que las variedades de mayor impacto pueden mantenerse en el mercado entre 6 a 12 meses por tanto el desarrollo de nuevas tecnologías para la propagación de las mismas deben tener en cuenta ésta particularidad.

## **2.6. Aclimatización**

### **2.6.1. Fisiología del cultivo *in vitro* que repercute directamente en la aclimatización**

#### *Respuesta de los tejidos*

1. Alteración del contenido de ceras epicuticulares
2. Funcionamiento sistemático anormal
3. Disminución del contenido de clorofila
4. Menor peso seco final
5. Disminución del área foliar
6. Disminución del número estomático
7. Menor desarrollo anatómico

#### *Respuesta de la planta*

1. Crecimiento suculento
2. Desórdenes fisiológicos y morfológicos
3. Menor tasa de crecimiento
4. Presencia de contaminación
5. Mayor frecuencia de mutaciones

Como consecuencia del ambiente *in vitro*, todos los factores descritos anteriormente contribuyen al desarrollo de la planta con un fenotipo incapaz de sobrevivir al trasplante a invernadero o campo (Preece y Suter, 1991) debido al estrés hídrico provocado por la ausencia de regulación estomática (Ziv *et al.*, 1987) y menor cantidad de ceras epicuticulares (Conner y Conner, 1984; Sutter, 1988), tallos más delgados, reducción de tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células y crecimiento heterótrofo o mixótrofo. Estos aspectos fisiológicos de la planta *in vitro* indican que es necesaria

una etapa especial que permita el retorno gradual de estas plantas a sus características normales.

La aclimatización es un proceso necesario y gradual, a través del cual se reducen al máximo las pérdidas de las plantas *in vitro* después de su trasplante a condiciones *in vitro* donde las plantas deben adaptarse a las nuevas condiciones, de forma progresiva respecto a su estructura y fisiología y deja de ser un organismo heterótrofo o mixótrofo (nula o baja capacidad fotosintética). Durante la fase de adaptación estas plantas están forzadas a ser completamente autótrofas y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, CO<sub>2</sub> y luz. Este cambio en las plantas, así como, la morfología de las mismas, determina la susceptibilidad durante las etapas iniciales del proceso de aclimatización. Los objetivos primarios de esta fase son lograr la supervivencia de las plantas al momento del trasplante y el inicio del crecimiento de las mismas (Jiménez y Caballero 1990; Moran, 2008).

La fase de aclimatización es la etapa final del proceso de micropropagación de ahí que sea trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción o bancos de semillas para ser multiplicadas.

Las plantas producidas *in vitro* presentan la cutícula poco desarrollada, debido a la alta humedad relativa presente en el tubo de ensayo (90-100%), lo que provoca una excesiva pérdida de agua post- trasplante, las hojas son delgadas, blandas y fotosintéticamente poco activas, presentando pocas y pequeñas células de parénquima empalizada, con baja eficiencia en el uso de la luz y con grandes espacios en el mesófilo, los estomas no operan adecuadamente, siendo la causa de mayor pérdida de agua durante las primeras horas de aclimatización, a su vez, existe una pobre conexión vascular lo que reduce la conducción de agua, además las raíces son poco funcionales, presentando epidermis no suberificadas y pocos pelos radicales, los que generalmente mueren post-trasplante y debe ser regenerados (Nava, 2008; Bazaldú-Muñoz *et al.*, 2008).

Lo fundamental de esta etapa es que las plantas forman un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la

efectividad de sus raíces. Este período es crucial en la vida de las plantas, para evitar que se produzca situación de estrés a plantas que inician su desarrollo, cuya manifestación podría no ser observable, hasta que el individuo no haya alcanzado la fase adulta (Roca, 1991).

### **2.6.2. Técnicas de aclimatización**

Diversas técnicas han sido aplicadas a las plantas *in vitro* para lograr su aclimatización, todas ellas con el propósito de lograr su supervivencia y calidad fisiológica antes de la plantación a campo. A continuación se hará referencias a algunas de ellas (Santanmaría *et al.*, 2000).

El proceso de aclimatización se puede comenzar mientras las plantas estén *in vitro* (Ziv, 1986) logrando incrementar el porcentaje de supervivencia hasta un 90% con nueve días destapadas antes del trasplante. Millar (1983) propuso destapar las plantas unos días antes en el propio lugar donde se adaptarán las vitroplantas, es decir, en el invernadero o en el propio campo. Contrario a lo que se supone, la contaminación del medio que contiene sacarosa no se convierte en un problema a menos que las vasijas se mantengan destapadas durante tiempo; el destapado se debe hacer por etapas y es muy útil en los lugares donde no hay control sobre la humedad.

Rodríguez (1990) plantea que las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento deben transcurrir la mitad del tiempo en la cámara de crecimiento y la otra mitad en el invernadero, donde los cultivos reciben la luz natural con mayor intensidad.

(Donan, 1991) recomienda colocar los recipientes de los cultivos a invernaderos por algunos días antes de sacar las plantas, esto con la finalidad de lograr preadaptarse a los regímenes de luz y de temperatura que prevalecerá en el invernadero durante el trasplante. Con tal procedimiento se puede ocasionar un problema de acumulación de calor al tocar los recipientes tapados debido a un doble efecto de invernadero, este problema puede solucionarse quitando las tapas de los recipientes de los cultivos siempre y cuando se procure proporcionar a las plantas una alta humedad relativa para prevenir su desecación.

Para garantizar estas condiciones de aclimatización son necesarias instalaciones que regulen las condiciones ambientales naturales tratando de brindar

fundamentalmente condiciones de humedad e iluminación que atenúen el cambio de las condiciones *in vitro* a las condiciones *in vivo*.

### **2.6.3. Instalaciones para la aclimatización**

Los umbráculos son las instalaciones más sencillas y de más bajo costo. La estructura puede ser de diversos materiales, pero lo más frecuente es la tubería galvanizada con un tejido de alambre al que se sujeta la malla plástica de sombra que por lo general es de polipropileno, es una magnífica instalación para lugares donde el viento es muy fuerte, excepto para las plantas altamente exigentes a humedad ambiental. Entre los inconvenientes del umbráculo está su baja protección del viento y que la temperatura del suelo es inferior a la del suelo que se encuentra al aire libre, la cual puede afectar al cultivo que requiere buena temperatura de raíz (Jiménez y Caballero, 1990; Agramonte *et al.*, 1998; Jiménez, 2009).

El umbráculo es un lugar creado para proteger a las plantas de un proceso de luz principalmente. Sus desventajas radican que no permite controlar las inclemencias del tiempo como las bajas temperaturas, las lluvias, aunque puede influir a la fuerte acción del viento independientemente de su emisión principal (Quesada, 1994; Agramonte *et al.*, 1998).

Bajo el nombre de invernadero, se conoce toda aquella estructura cerrada con una cubierta plástica. De la calidad de la cubierta dependerá en principio un mejor o peor efecto invernadero y por lo tanto a un mejor o peor clima en la zona protegida, (Agramonte *et al.*, 1998).

Las bondades del invernadero la definen tres aspectos (Zan de Galdeano, 1990).

- La capacidad para regular climatología en función del cultivo y del clima exterior.
- Su funcionalidad, es decir, su montaje y diseño que permite económicamente un óptimo estado técnico.
- Su viabilidad futura

(Jiménez, 2009) define dos grupos de invernaderos: por un lado, aquellos que tratan de aprovechar al menor costo posible las ventajas climáticas de las zonas donde se ubica y por otra, las que utilizan sistema activo de manejo climático. El

principal problema de los invernaderos en el trópico es que en el verano su temperatura interior llega a los 40° C a veces incluso sombreando, y la humedad relativa desciende a niveles muy peligrosos para todos los cultivos.

La solución que suele adaptarse es sombrear llegando a interceptar entre el 70 al 75% de la radiación incidente.

Los cambios rápidos notables a las técnicas biotecnológicas utilizadas a la producción vegetativa señalan la utilización de invernaderos con cobertura plástica en la fase de aclimatización. Los mismos constituyen sistemas sencillos de control climático con equipos de riegos y fertilización, etc., se ha difundido ambientalmente con el fin de aumentar la producción y calidad.

#### **2.6.5. Manejo de las plantas en la aclimatización**

Durante el cultivo *in vitro* las plantas tienen un escenario con alta humedad relativa (entre 85 y 100%), baja irradiación, carencia de CO<sub>2</sub>, presencia de fuentes de carbono y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo; las que inducen en la planta el desarrollo de una estructura y fisiología poco desarrollada. Las raíces son sensibles a sufrir daños, son poco funcionales, la fotosíntesis es baja y su aparato estomático es poco funcional (Pospíšilová *et al.*, 1999 y Bazaldú-Muñoz *et al.*, 2008).

Para alcanzar plantas aclimatizadas de una mejor calidad y uniformidad suficiente para ser llevadas a campo, el manejo de las plantas cultivadas *in vitro* debe ser paulatino y procurando hacer el menor perjuicio a las plantas. Esta etapa es donde ocurren la mayor cantidad de pérdidas (Sosa-Rodríguez *et al.*, 2009).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación se realizó en la Biofábrica de Cienfuegos, ubicada en Carretera a Palmira Km 4, perteneciente a la UEB Semillas, provincia de Cienfuegos y en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en el municipio Santo Domingo de la provincia Villa Clara, durante el período comprendido entre enero del 2010 a febrero del 2012.

#### **3.1. Material Vegetativo**

Se seleccionaron los genotipos 'INIVIT Y 93-4', 'CEMSA 74-6329', 'CMC-40' y 'INIVIT Y 80+1', teniendo en cuenta su importancia para la producción de yuca durante todo el año en Cuba.

##### ***Descripción de los clones***

'INIVIT Y 93-4': La planta alcanza una altura entre 1,5 y 2,5 metros de altura, presenta de tres a cuatro ramificaciones por planta, tallos de color gris, hojas lanceoladas, de cinco a siete lóbulos, de color verde claro tanto en el pecíolo como en las nervaduras. Posee más de ocho raíces por planta, rugosas, cónicas, de color castaño claro, subepidermis crema y pulpa blanca. Ciclo de cosecha a partir de los ocho meses.

'CEMSA 74-6329': Presenta tallo erecto, medianamente ramificado, de color gris claro y grosor intermedio. Las plantas son de baja altura. Las hojas son muy lobuladas con lóbulo central elíptico. El follaje joven es verde carmelitoso, mientras que el adulto es verde. Las nervaduras son verdes tanto por el haz como por el envés. El brote terminal es lampiño, tiene baja retención del follaje. El pecíolo es rojo verde por la parte superior y verde rojo por la inferior tanto en hojas jóvenes como adultas, son largas y están ubicadas en posición horizontal. El punto de inserción limbo – pecíolo es rojo y el punto de inserción pecíolo – tallo es púrpura. Produce un número medio de raíces con pocas comerciales.

'CMC-40': Tallo acostado, medianamente ramificado, de color carmelita oscuro y grosor intermedio lo mismo que la longitud de la filotaxia. La planta es de baja altura. Las hojas son medianamente lobuladas con lóbulo central elíptico y corto. El follaje joven lo mismo que las nervaduras por el haz y el envés son de color

verde claro, mientras que el follaje adulto es verde. Tiene el brote terminal lampiño y baja retención del follaje. El pecíolo es rojo por ambas partes tanto en hojas jóvenes como adultas con una longitud media. El punto de inserción limbo – pecíolo es verde pero el punto de inserción pecíolo – tallo es de color púrpura. Produce un número medio de raíces comerciales/planta y pocas raíces no comerciales.

‘INIVIT Y 80+1’: Clon obtenido en el programa de fitomejoramiento en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), a partir del clon ‘CMC-40’ plantas de 1,5 – 3,0 m de altura o más sin ramificación de porte erecto, tallos de color marrón oscuro, hojas con 5 – 7 lóbulos, follaje joven azul - rojizo, pecíolos de color púrpura tanto en las hojas jóvenes como en las adultas, nervaduras rojo - verde por el haz y por el envés verde - rojo, hojas adultas de color verde, lóbulos simples y pecíolos inclinados hacia arriba de forma irregular, posee generalmente más de nueve raíces por planta, de superficie rugosa y crecimiento oblicuo, sésiles, cónicas o cilíndricas, película externa de color castaño oscuro, corteza rosada y pulpa de color blanco, ciclo de cosecha a partir de los siete meses.

#### ***Implantación y micropropagación del material vegetativo.***

El stock de plantas donantes *in vitro* fue establecido de la siguiente forma: se tomaron estacas de 20 a 25 cm de longitud y fueron plantadas en cámaras del Centro de Reproducción Acelerada de Semilla (CRAS) que contenían un sustrato formado por suelo pardo con carbonatos y cachaza en una proporción de 3:1. Se le aplicaron riegos periódicamente para mantener la humedad adecuada. También se realizaron aplicaciones fitosanitarias semanales.

Aproximadamente cuatro semanas después de la plantación se cortaron las yemas terminales con 3 ó 5 cm de tallos. La desinfección se realizó de la siguiente forma: lavado de las yemas con agua corriente varias veces, posteriormente se sumergieron las yemas en una solución de etanol (70%) por 1 minuto, después se colocaron en otra solución de hipoclorito de sodio (2,5%) por 5 minutos y finalmente se lavaron las yemas 4 ó 5 veces con agua destilada estéril y se mantuvieron en un frasco con agua destilada estéril hasta su siembra *in vitro*. Bajo condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar los explantes fueron

extraídos con un tamaño de 0,5 – 1,0 mm y colocados sobre el medio de cultivo siguiente: sales de MS (1962), tiamina (1 mg.L<sup>-1</sup>), mioinositol (100 mg.L<sup>-1</sup>), sacarosa (20 g.L<sup>-1</sup>), 6-Bencilaminopurina (BAP) (0,04 mg.L<sup>-1</sup>), Ácido Naftalen Acético (ANA) (0,02 mg.L<sup>-1</sup>), Ácido Gibérelico (AG<sub>3</sub>) (0,05 mg.L<sup>-1</sup>), Agar (6,5 g.L<sup>-1</sup>) y pH 5.7, donde se obtuvieron plantas completas a los 30 días (Roca *et al.*, 1991; Medero, 1995).

Para la entrega de los clones seleccionados a la Biofábrica fueron utilizados tubos de cultivo con una microestaca de 1,5 a 2,0 cm de longitud, procedentes de plantas desarrolladas *in vitro*.

### **3.2. Procedimientos generales**

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C de temperatura y una presión de 1,2 Kg/cm<sup>2</sup>; el tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio, según información técnica de SIGMA (1991). Las placas Petri de 80 x 15mm para la manipulación del material desinfectado se esterilizaron por aire seco a 180°C durante 2 horas, empleando para este proceso una estufa. La manipulación del material vegetal desinfectado, se realizó dentro de una cabina de flujo laminar horizontal.

Para la propagación *in vitro* se utilizó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS). Los medios se solidificaron con AgarE a razón de 6,5 g.L<sup>-1</sup>. En cada experimento se sembraron un total de 30 réplicas por cada tratamiento, los que se incubaron en condiciones de luz natural, con fotoperíodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad, a una temperatura de 28±2 °C.

### **3.3. Evaluación de la micropropagación de los cuatro genotipos de yuca en la Biofábrica.**

Los clones propagados *in vitro* y en tercer subcultivo fueron recibidos desde el Laboratorio de Biotecnología del INIVIT. En condiciones de Biofábrica estos materiales se sembraron en un medio de cultivo semisólido gelificado con AgarE, se colocaron cinco explantes por frasco biotecnológico (pomos), los explantes se cortaron a 2,5 cm de altura, con dos yemas cada explante, así como el medio de cultivo se esterilizó con G-1 (esterilización química) y autoclave. Se realizaron tres

subcultivos cada 35 días y la evaluación se realizó en el momento del trasplante a la fase de aclimatización, donde se tuvo en cuenta las siguientes variables:

- Altura de la vitroplanta (cm)
- Número de hojas de la vitroplanta
- Número de raíces de la vitroplanta
- Coeficiente de Multiplicación

### **3.4. Aclimatización de las vitroplantas. Efecto del uso del cobertor.**

Las vitroplantas producidas de los cuatro genotipos fueron trasplantadas al área de aclimatización de la Biofábrica y de forma paralela se comparó con el método recomendado por el INIVIT. Se compararon las variantes siguientes:

1. Área de aclimatización, según modelo desarrollado para las Biofábricas en Cuba (Pérez, 1998).
2. Nuevo método constituido por una Caja de madera de 100 cm x 60 cm forrada con nylon según Medero *et al.* (2011).

Se utilizaron para el experimento más de 500 vitroplantas y transcurridas cuatro semanas se realizaron las evaluaciones siguientes:

1. Supervivencia de las vitroplantas expresada en porcentaje
2. Cambios de coloración en las hojas y tallo
3. Presencia de plántulas con las hojas deformadas

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente según el diseño, el cual consistió en la aplicación de una prueba de hipótesis para muestras independientes en los casos que se compararon dos tratamientos y análisis de varianza de clasificación simple (en el caso de las variables continuas) para comparar varios tratamientos. La comparación múltiple de medias se realizó según las dójimas de Tukey sí existía homogeneidad de varianza y Dunnett´C en caso contrario. Además, análisis de varianza por rangos según Kruskal-Wallis con posterior aplicación de Mann-Whitney y Mann-Whitney cuando se trataba de dos tratamientos solamente (para las variables expresadas en porcentaje).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3. Evaluación de la micropropagación de los cuatro genotipos de yuca en la Biofábrica.

#### 4.3.1. Efecto de la esterilización con G1 para la micropropagación

Al evaluar la metodología de micropropagación de la yuca en la Biofábrica de Cienfuegos los explantes fueron transferidos en cabina de flujo laminar (Figura 1) al medio de cultivo de multiplicación. Como resultado se obtuvo que a los seis días de la siembra los explantes colocados en el medio esterilizado con G1 tomaron una coloración blanquecina, o sea a perder clorofila (Figura 2) y fue necesario subcultivar de inmediato para transferirlos a un medio fresco, pero esterilizado en autoclave, donde los explantes continuaron con su desarrollo normal (Figura 3). Los resultados obtenidos demostraron que el esterilizante químico G1 no puede utilizarse en el proceso de la micropropagación de la yuca, aunque otros autores señalan su ventaja para la propagación masiva de otros cultivos (Pérez *et al.*, 1998).

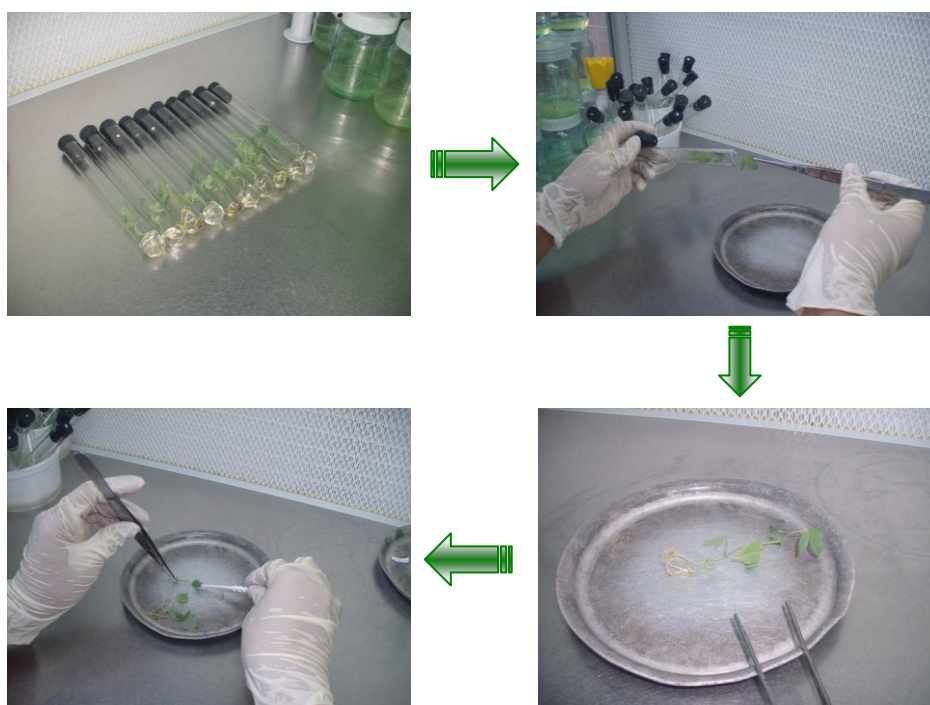


Figura 1. Secuencia del manejo del explante de yuca en el primer subcultivo.



Figura 2. Primer subcultivo de multiplicación del clon 'CMC-40' en el medio de cultivo esterilizado con G1.



Figura 3. Segundo subcultivo de multiplicación del clon 'CMC-40' en el medio de cultivo esterilizado con autoclave.

#### 4.3.2. Evaluación de la micropropagación del clon 'CMC-40' durante seis subcultivos

Como se puede observar en la Tabla 1, durante el cuarto subcultivo se alcanzó el mayor coeficiente de multiplicación (2,20), sin diferencias estadísticas con los obtenidos durante los subcultivos uno, cinco y seis, pero sí con los del segundo tercero. Estos resultados pudieron estar dados por un mal manejo durante el corte de los explantes o debido a otras causas como los componentes del medio de cultivo, tiempo de esterilización, condiciones ambientales, etc. El menor coeficiente de multiplicación se obtuvo durante el tercer subcultivo.

Tabla 1. Resultados obtenidos para la variable coeficiente de multiplicación en el clon 'CMC-40' durante seis subcultivos.

Subcultivo	Coeficiente de multiplicación	Media de rango
1	1,80	12,50 ab
2	1,23	5,17 b
3	1,20	4,83 b
4	2,20	16,50 a
5	1,63	10,17 ab
6	1,40	7,83 ab
KW		11,81*

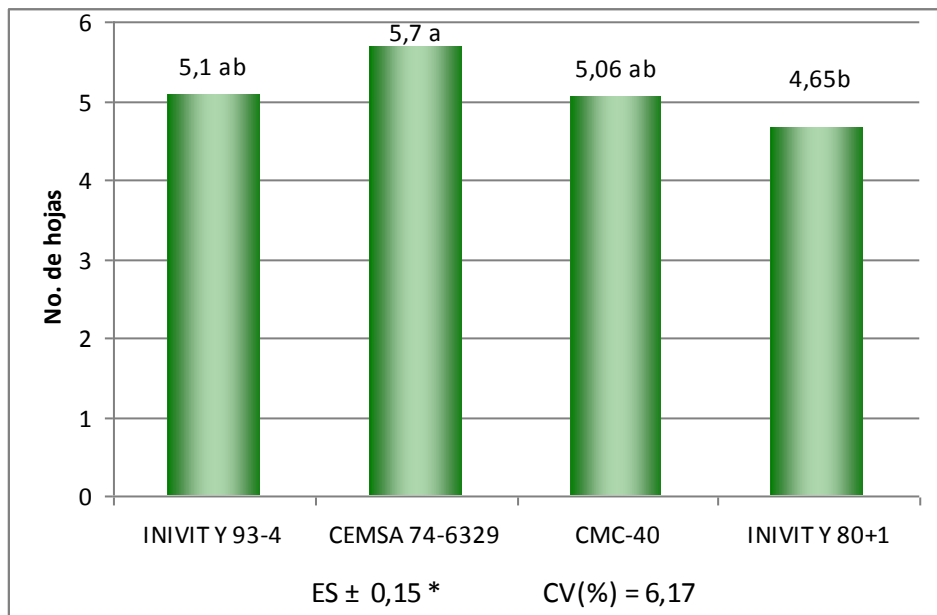
Los resultados obtenidos demostraron la presencia de contaminantes principalmente por hongos durante la micropropagación del clon 'CMC-40' (Tabla 2), donde se puede observar que para evaluaciones realizadas durante los seis subcultivos, en el segundo se obtuvo el mayor porcentaje de contaminación (21,80%) y el menor (4,83%) durante el quinto subcultivo. De forma general, se puede decir que los porcentajes de contaminación producidos se encuentran dentro del rango de aceptación para los laboratorios de cultivos de tejidos y las biofábricas cuando se trabaja en la adopción de nuevas metodologías. Basail (2001), encontró un 3.3% de contaminación en el clon 'CMC-40'.

Tabla 2. Resultados obtenidos para la variable porcentaje de contaminación en el cultivar 'CMC-40' durante seis subcultivos.

Subcultivo	% de contaminación	Media de rango
1	21,57	12,50 a
2	21,80	15,00 a
3	18,97	13,17 a
4	4,97	4,33 b
5	4,83	4,67 b
6	9,30	7,33 b
KW		11,32*

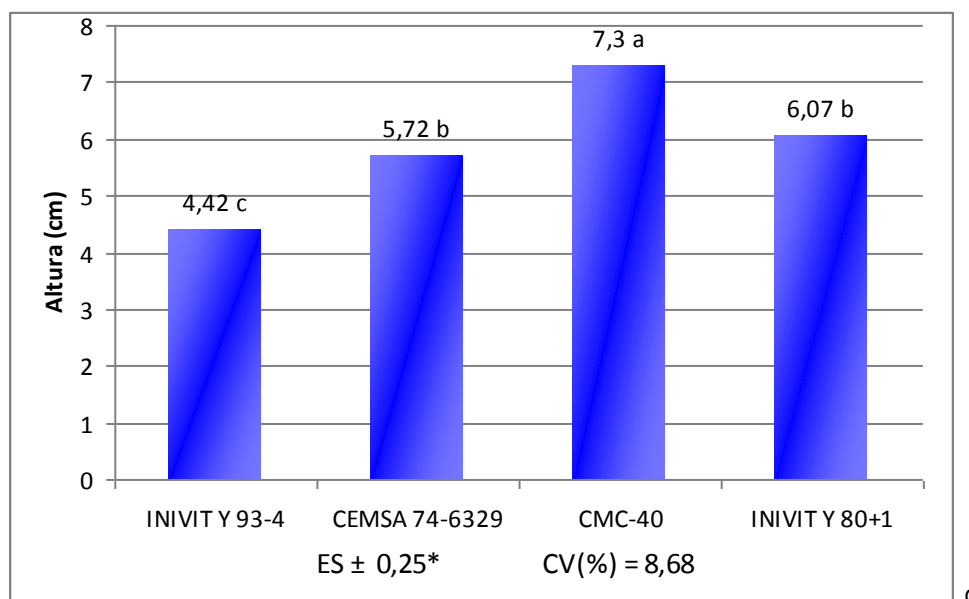
#### 4.3.3. Respuesta de cuatro cultivares de yuca al momento del trasplante a la fase de aclimatización

En la Figura 4, se puede observar la respuesta de la variable número de hojas durante el séptimo subcultivo en el medio de cultivo para multiplicación. Los resultados obtenidos muestran que la media más alta (5,7) se obtuvo con el clon 'CEMSA 74-6329', sin diferencias significativas con los clones 'INIVIT Y 93-4' (5,1), 'CMC-40' (5,06) y sí con el clon 'INIVIT Y 80+1'. La mayor altura fue obtenida por el clon 'CMC-40' (7,3 cm) con diferencias estadísticas significativas alcanzadas por los tres clones restantes (Figura 5); mientras que la menor altura fue alcanzada por el clon 'INIVIT Y 93-4' (4,42 cm). Para la variable número de raíces por planta la mejor respuesta fue para el clon 'INIVIT Y 80+1' (7,97) con diferencias estadísticas significativas a los clones restantes y el clon que menos raíces produjo fue el 'CEMSA 74-6329' con promedio de 3,95 raíces por vitroplantas. Como es conocido la calidad de la vitroplanta en el momento del trasplante tiene un efecto marcado en los porcentajes de sobrevivencia de las plántulas en condiciones *ex vitro*.



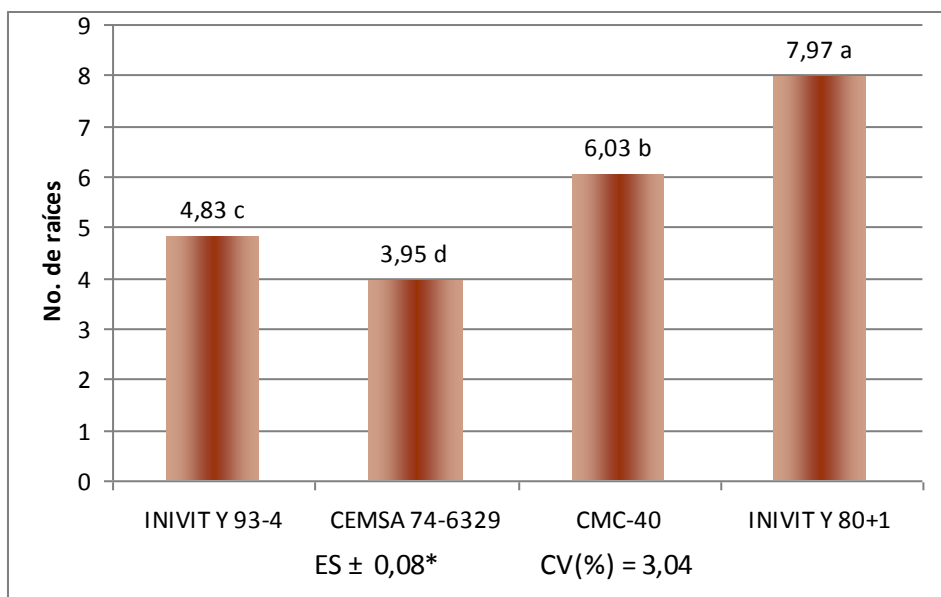
Media con letras desiguales difieren para  $p < 0,05$  según dócima de Dunnett' C

Figura 4. Respuesta del número de hojas activas de las vitroplantas durante el séptimo subcultivo en la Biofábrica.



Medias con letras desiguales difieren para  $p < 0,05$  según dócima de Tukey

Figura 5. Respuesta de la altura (cm) de las vitroplantas durante el séptimo subcultivo en la Biofábrica.



Media con letras desiguales difieren para  $p < 0,05$  según d'cimo de Dunnett'C

Figura 6. Respuesta del número de raíces de las vitroplantas durante el séptimo subcultivo en la Biofábrica,

Por otra parte, se encontró que durante este subcultivo (séptimo) el coeficiente de multiplicación para los cuatro genotipos estudiados fue superior a 2,0 (Tabla 3), y además, el mayor fue obtenido por el clon 'INIVIT Y 80+1' (2,7) sin diferencias estadísticas significativas con los del clon 'INIVIT Y 93-4' (2,5), pero sí con los dos clones restantes.

Tabla 3. Coeficiente de multiplicación alcanzado por las vitroplantas de yuca durante el séptimo subcultivo en la Biofábrica.

Clones	Coeficiente de multiplicación	Media de rango
'INIVIT Y 93-4'	2,5	44,00ab
'CEMSA 74-6329'	2,1	30,00bc
'CMC-40'	2,0	27,83c
'INIVIT Y 80+1'	2,7	47,63a
Kruskal-Wallis (KW)		15,96*

#### 4.4. Aclimatización de las vitroplantas. Efecto del uso del cobertor.

Obtener un alto porcentaje de sobrevivencia durante la fase de aclimatización es importante para reducir el costo de la producción de vitroplantas y además necesario para garantizar el éxito en la adopción de la metodología por las Biofábricas. Al respecto, se encontró un efecto marcado de las combinación clon-método de aclimatización ya que los mejores resultados en cuanto a la variable porcentaje de sobrevivencia fueron alcanzados cuando se utilizó el clon 'CMC-40' (94,30%) y las vitroplantas fueron cubiertas con el cobertor durante sus primeros días en condiciones *ex vitro* (Tabla 4), con diferencias estadísticas significativas al resto de las combinaciones. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que para la aclimatización de la yuca se requiere mantener una alta humedad relativa durante los primeros diez días después del trasplante para lograr mayor éxito en esta fase. Otro factor importante lo constituye la calidad de la vitroplanta al momento del trasplante ya que la calidad del material vegetal *in vitro* tiene gran influencia en el porcentaje de supervivencia *ex vitro*. También, se encontró una marcada influencia del genotipo ya que el clon 'CMC-40' mostró el mayor porcentaje de sobrevivencia (92,15%) con diferencias estadísticas significativas a los tres clones restantes (Tabla 5). En general, para la fase de aclimatización de las vitroplantas de yuca micropropagadas se observó que con el empleo del cobertor (cámara húmeda) se incrementaron los porcentajes de sobrevivencia hasta el 87,51% con relación a un 75,79% cuando no se aplicó el cobertor (Tabla 6). Gallardo *et al.* (2002) durante la fase de aclimatización de la variedad de papaya 'IBP 42-99' obtuvieron resultados similares cuando cubrieron las plántulas individualmente con frascos de vidrio (250ml) durante cuatro semanas y con ello garantizaron que durante los períodos de riego sólo se humedeciera el sustrato y se mantuviera la humedad con lo cual aumentaron los porcentajes de sobrevivencia de las plántulas.

Tabla 4. Resultados obtenidos para la variable supervivencia en fase de aclimatización para las combinaciones clon-método de aclimatización.

Tratamientos	Supervivencia	Media de rango
'CEMSA 79-6329' - Cobertor	82,14	14,00 e
'CEMSA 79-6329' -Tradicional	82,14	2,50 g
'INIVIT Y-93-4' - Cobertor	85,70	18,50 d
'INIVIT Y-93-4' - Tradicional	75,00	6,50 f
'INIVIT-80+1' - Cobertor	87,90	22,50 c
'INIVIT-80+1' - Tradicional	81,00	11,00 e
'CMC-40' - Cobertor	94,30	30,50 a
'CMC-40' - Tradicional	90,00	26,50 b
KW=		30,40**

Tabla 5. Resultados obtenidos para la variable supervivencia en fase de aclimatización para los clones (independientemente del Método).

Tratamientos	Supervivencia	Media de rango
'CEMSA 79-6329'	69,64	8,25 d
'INIVIT Y-93-4'	80,35	12,50 c
'INIVIT-80+1'	84,45	16,75 b
'CMC-40'	92,15	28,50 a
KW=		20,75**

Tabla 6. Resultados obtenidos para la variable supervivencia de las vitroplantas con los dos métodos de aclimatización (independientemente de los clones)

Tratamientos	Supervivencia	Media de rango
Método con Cobertor	87,51	21,38 a
Método Tradicional	75,79	11,63 b
U de Mann-Whitney		50,00**

En general, se observó que las vitroplantas sembradas en el área de aclimatización con el nuevo método (Figura 7) a los 25 días mostraron un desarrollo uniforme y altos porcentajes de supervivencia (Figura 8), además a los 45 días del trasplante las vitroplantas de yuca alcanzaron 12,0 cm de altura y más de 5 hojas activas lo cual garantiza su transferencia a campo (Figura 9). Los clones micropropagados continúan su desarrollo bajo las condiciones de la fase de

aclimatización y pueden ser utilizados para otras estrategias de propagación no convencional (Figuras 10, 11, 12 y 13) con el objetivo de garantizar la producción de una mayor calidad y cantidad de semilla que pueda garantizar su inserción en el Esquema de Producción de Semilla Certificada de yuca en la provincia de Cienfuegos.



Figura 7. Aclimatización de las vitroplantas con el uso del cobertor (nuevo método).



Figura 8. Supervivencia de las vitroplantas a los 25 días del trasplante cultivo con el uso del cobertor (nuevo método).



Figura 9. Vitroplantas del clon 'CEMSA 74-6329' lista para plantar en campo a los 45 días de transplante.



Figura 10. Vitróplantas del clon 'INIVIT Y 93-4' a los 90 días de aclimatizadas.



Figura 11. Vitróplantas del clon 'INIVIT Y 80+1' a los 90 días de aclimatizadas.



Figura 12. Vitroplantas del clon 'CEMSA 74-6329' a los 90 días de aclimatizadas.



Figura 13. Vitroplantas del clon 'CMC-40' a los 90 días de aclimatizadas.

## **5. CONCLUSIONES**

1. Se logró implementar la micropropagación de la yuca en la Biofábrica de Cienfuegos a partir de 4 clones comerciales donde se adquirieron los manejos y habilidades para obtener coeficientes de multiplicación y que las pérdidas por contaminaciones se encuentren dentro del rango permisible para estas entidades.
2. No fue factible utilizar el G1 como esterilizante químico para la micropropagación de la yuca.
3. Se incrementaron los porcentajes de supervivencia al aplicar el nuevo método de aclimatización, mediante el empleo de cobertores como cámara húmeda.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Consolidar la micropropagación de la yuca en la Biofábrica de Cienfuegos y aplicar estos resultados en otras entidades de su tipo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

### 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D, J., F, & Dita, M.A. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Villa Clara: Instituto de biotecnología de las plantas.
- Bajaj, Y. P. S. (1978). In vitro clonal propagation of cassava. *Current Science*, 47(24), 971-972.
- Basail, M. (2001). *Propagación de la yuca (Manihot esculenta, Crantz) en Sistema de Inmersión Temporal* (Tesis para optar por grado de Ingeniera Agrónoma). UCLV.
- Bazaldú, M, Z., C. V, & Morales, V. S, M., G. (2008). Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.) Propagadas por cultivo de meristemas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(2), 147-150.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1985). Pahtology. *Cassava Program annual report* (págs. 334-360). Cali: Biotechnology research unit.
- Cock, J.H. (1989). *La yuca, nuevo potencial para un cultivo tradicional*. CIAT.
- Cohen, J.I. (1989). Biotechnology research for the developing world. *Trends in Biotechnonology*, 7(11), 295-303.
- Conner, L. N., & Conner, A. J. (1984). Comparative waterloss from leaves of *solanum lacinatedum* plants cultured *in vitro* and *in vivo*. *Plant. Sci. Let.*, (36), 241-246.
- Debergh. (1983). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort*, (14), 335-345.
- Domínguez, C.E, C., L.F, & Fuente, C. (1983). *Morfología de la planta de yuca*.
- Donan, A. (1991). *Establishment of tissue culture grown in that greenhouse enviroment*. Proceedigs Florida State Horticultural Socrety.
- FAO. (2007). FAO Los datos de FAOSTAT. Recuperado a partir de <http://www.fao.org>
- Frison, E.A. (1987a). Tissue culture and cassava sanitation (pág. 44). Presented at the Seminaire Internacional la Mosaique Agricaine du Manioc et son Controle,

- Cote d'Ivoire., Roma: Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Developpement en Cooperation.
- Frison, E.A. (1987b). Tissue culture et sanitation du manioc. (pág. 2). Presented at the Seminaire Internacional sur la Mosaïque Agricaine du Manioc et son Controle, Yamoussoukro, Cote d'Ivoire. Actes du seminarie. Paris, Roma: Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Developpement en Cooperation.
- Gamborg, O.L., & Kartha, K.K. (1976). *In vitro* techniques in the control of cassava mosaic disease. *African Cassava Mosaic, Muguga, Kenya. Report of an Interdisciplinary Workshopp.* (págs. 30-35). Canadá: International Development Research Center.
- Hu, C.V., & Wang, J.P.. (1983). Meristem, shoot tip and bud culture. *Handbook of Plant Cell Culture.* (págs. 177-227). New York: Macmiiian Publishing.
- Jiménez, E. (2009). Conferencia sobre propagación vía organogénesis, fase III enraizamiento y fase IV aclimatización. Presented at the Novena edición de la Maestría en Biotecnología Vegeta, Santa Clara, Cuba.
- Jiménez, E, D. F., M. (1998). *Empleo de biorreactores para la Propagación Masiva. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.*
- Jiménez, E, P., J. (1998). *Generalidades del cultivo in vitro.* Universidad Central de las Villas Santa Clara. Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Jiménez, R, C., M. (1990). El cultivo industrial de plantas en macetas. Ediciones.. . (Horticultura.). Madrid.
- Kaiser, W.J., & Teemba, L.R. (1979). Use of tissue culture and thermoherapy to free east African cassava cultivars of African cassava mosaic and cassava brown streak diseases. *Plant disease reporter*, 63(9), 780-784.
- Kartha, K.K, & Gamborg, O.L. (1975). Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. *Phytopathology*, 65(7), 826-828.
- Kartha, K.K. (1975). Meristem culture. *Plant tissue culture methods* (págs. 39-43). Estados Unidos: Saskatchewan, National Research Council.

- Kartha, K.K., & Gamborg, O.L. (1979). Meristem culture techniques in the production of disease free plants and freeze - preservation of germ plasm of tropical tuber crops and grain legumes. *International Symposium on Diseases of Tropical Food Crops, Louvain - La - Neuve, Belgium*. (págs. 267-283). Bélgica: Neuve, Universite Catholique de Louvain.
- Konan, N.K, Sangwan, R.S., & Sangwan, B.S. (1994). Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Maniot Esculenta*, Crantz). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 91-102.
- López, Z. M, V., E, & López,R. (1984). *Raíces y Tubérculos*. Ciudad de la Habana: Pueblo y Educación.
- Lozano, J.C, T., J.C, & Castro,A, B., A.C. (1977). Producción de material de siembra de yuca. CIAT.
- Maffla, G., Roa, J.C., & Roca, W.M. (1984). Erradicación de la enfermedad cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta*, Crantz), por medio del cultivo de meristemas. Efecto de la temorterapia, y del tamaño del explante sobre la tasa de saneamiento. Presented at the Congreso Nacional de Cultivo de Tejidos Vegetales, Bogotá: Universidd Nacional de Colombia.
- Medero, V. (1995). *Regeneración por embriogénesis somática de la yuca (Manihot Esculenta, Crantz)* (Tesis Master of Science en Biotecnología Vegetal). Instituto de Biotecnología de las Plantas (I.B.P.) – UCLV.
- Medero, V. (2006). *Embriogénesis somática en yuca (Manihot esculenta, Crantz)*. (Tesis Doctoral). Universidad de Ciego de Ávila., Ciego de Ávila.
- Millar, D. (1983). Weaning and growing-on of micropropagated plants. the international plant propagation society.
- Mireles, M., & Páez, J. (1984). Inducción de «Roseta» en Yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) para la Propagación Múltiple de la planta *in vitro*. *Rev. Facultad de Agronomía*, 33.
- Montaldo, A. (1985). *La Yuca o Mandioca*. San José, Costa Rica: IICA.
- Montaldo, A. (1991). *Cultivo de Raíces y Tubérculos Tropicales*. San José Costa Rica: IICA.

- Morán, P. (2008). Implementación de técnicas de aclimatización para plantas micropropagadas de Vid (*Vitis vinifera* L.). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Morita, A. (1992). A critical moment for japanese managenet. *Economic Eye Autumn*.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Nair, N.G. (1984). Tissue culture for the multiplication of disease free planting material. *Indian Farming*, 33(12), 45-46.
- Nava, J. (2008). *Propagación in vitro y establecimiento en invernadero de las orquídeas Trichocentrum carthagenense (jacq.) Sw. y Laelia eyermaniana rchb. F. para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable*. (Tesis Doctoral). Universidad de Morelos, Morelos.
- NG, S.Y. (1985). Recommendations for handling tissue culture materials (sweet potato, yam and cassava). Nigeria, International Institute of Tropical Agriculture.
- Noerhadi, E., & Widiyanto, S.N. (1982). Callus growth of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Tissue Culture*.
- Nolt, B.L. (1990). Production of virus-free Latin American cassava clones. *Workshop on the global status of and orospects for integrated pest management of root and tuber crops in the tropics* (págs. 78-85). Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture.
- Orellana, P., & Pérez, J. (1998). Introducción a la Propagación Masiva. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. (págs. 125-133). Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- Páez, J. (1989). Propagación *in vitro* de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz).
- Pérez, J., Jiménez, E., & Agramonte, D. (1998). Aumento de la eficiencia en la micropropagación. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. (págs. 179-190). Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.

- Pérez, J., Suárez, M., & Orellana, P. (2000). Posibilidades y potencial de la Propagación Masiva de Plantas en Cuba. *Bioteología Vegetal*, 1, 3-12.
- Preece, J.E, & Sutter, E.G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *Micropropagation: Technology and application* (págs. 71-93). Kluwer: Kluwer academic publishers, Dordrecht.
- Quesada, L. (1994). Manejo de plantas en invernadero. Primer Curso FAO, Francia-Cuba sobre técnicas de micropropagación *in vitro*. FAO.
- Raemakers, C.J. (1993). *Primary and cyclic somatic embryogenesis in cassava (Manihot esculenta, Crantz)*. (Tesis Doctoral). Agricultural University of Wageningen, the Netherlands., Netherlands.
- Roa, V.J. (1981). Cultivo de meristemas, termoterapia y quimioterapia para el saneamiento de clones de yuca (*Manihot esculenta, Crantz*) infectados con dos enfermedades virales. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Roca, W.M. (1979). Meristem culture in cassava: principles and procedures. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CALI.
- Roca, W.M. (1980). *Cultivo de Tejidos en Yuca*. Cali: Centro de Agricultura Tropical.
- Roca, W.M. (1984). *El cultivo de meristemas en yuca*. Cali: CIAT.
- Roca, W.M. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura Tropical*. Colombia: Editorial Cali.
- Roca, W.M., & Jayasinghe, U. (1982). *El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de Yuca*. Cali: CIAT.
- Roca, W.M., Arias, D.I, & Chavez, R. (1991). Métodos de conservación in vitro del Germoplasma. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura Tropical*. (págs. 697-713). Colombia: CIAT.
- Rodríguez, M.J. (1990). Aplicación de las Técnicas de Cultivo *in vitro* para la producción de plantas plataneras en las islas canarias. *Revista Agrícola Vergel*, (99), 190-197.
- Rodríguez, S. (1997). Estrategia de las Raíces y Tubérculos Tropicales de Cuba. Presented at the I encuentro nacional efectuado en el INIVIT, Santo Domingo, Cuba.

- Rodríguez, S., Folgueras, M., & Medero, V. (2000). La Yuca en Cuba. *Continente Yuquero.*, 2, 5.
- Rogers, D.J. (1963). Bull. Torrey. Bot. Club.
- Salazar, S.S. (1985). Cultivos de meristemas en cormos, Raíces y Tubérculos Tropicales. *Sistemas de producción basados en raíces y tubérculos tropicales*, 13(1), 6-7.
- Stamp, J.A. (1987). Somatic embryogenesis in Cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. *Annals of Botany*, 59(4), 451-459.
- Stamp, J.A., & Henshaw, G.G. (1982). Somatic Embryogenesis in Cassava. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 10, 183-187.
- Suárez, M., & Alvarado, Y. (1997). Sistema de control de calidad para las Biofábricas de múltiples cultivos. *Libro de resúmenes. Técnicas de avanzadas aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG 97* (págs. 2-5). Ciego de Ávila: Universidad de Ciego de Ávila.
- Sutter, E. (1988). Stomatal and cuticular waxes loss from apple, cherry and sweetgum plants alter renewal from culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113, 234-238.
- Tilquin, J.P. (1979). Plant regeneration from stem callus of cassava. *Can. J. Bot.*, 57, 61-63.
- Vasil, I. (1994). Automation in Plant Propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*, 39(2), 105-108.
- Villalobos, V.M., & Thorpe, T.A. (1991). Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. (págs. 128-141). Colombia: CIAT.
- Viñas, S. (1994). La Ingenierización y la Ingeniería Concurrente en los proyectos de la Industria Farmacéutica y la Biotecnología. *Revista Producao. Brasil*, 4(2), 117-120.
- Vuylsteke, D., & Langhe, E. De. (1985). Feasibility of *in vitro* propagation of Bananas and Plantains. *Trop. Agric. Trinidad*, 62, 323-328.
- Zambrano, M.O. (1985). Propagación in vitro de la yuca por medio del cultivo de meristemas. Presented at the Seminario Anual sobre La Yuca, 1, Portoviejo, Ecuador.

- Zanz de Galdeano, J. (1990). Invernaderos y túneles. *Revista agrícola vergel*, 106, 742-748.
- Ziv, M. (1986). In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. (págs. 187-196). London: Butter Worths.
- Ziv, M. (1989). Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured Gladiolus Buds By Growth Retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17, 101-110.
- Ziv, M., Schwarts, A., & Fleminger, D. (1987). Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant sci.*, 52, 127-134.