



Capítulo IX

175

Proceso de aclimatación y acondicionamiento de material vegetal con potencial productivo en condiciones protegidas semicontroladas

Linda Gómez Arias
Sandra Valbuena Aguilar
Tatiana Miranda Salas
Edwin Andrés Villagrán Munar

Introducción

Desde su descubrimiento como herramienta para la multiplicación masiva de especies vegetales, la micropropagación ha sido empleada para la producción a grandes escalas de material vegetal de importancia económica, ya que permite obtener, en menor tiempo y espacio, plántulas completas, con criterios de calidad. A partir de un explante obtenido de una planta madre sana y cultivado bajo condiciones de laboratorio, sobre un medio artificial, el cual le provee todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo, se puede multiplicar y producir un gran número de plántulas hijas o clones que conservan las mismas características de la madre.

El éxito de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales depende, en gran medida, de establecer todas las etapas del proceso, como son la propagación, el enraizamiento y la aclimatación de las plantas (Resende et al., 2015). Esta última es crítica, considerando que, durante la transición de *in vitro* a *ex vitro*, se presentan los problemas más serios, ya que en este momento ocurren las mayores pérdidas (Gil et al., 2017). Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales de la planta (Sánchez et al., 2012). Para reducir el estrés en la etapa de aclimatación e incrementar la supervivencia de las plántulas, es importante manejar adecuadamente la humedad relativa del aire, las condiciones del sustrato, la temperatura y la luz (Oliveira et al., 2013).

El uso de invernaderos con condiciones controladas permite programar las variables ambientales según la especie vegetal que se requiera aclimatar de forma gradual, lo que optimiza el proceso de adaptación de grandes cantidades de material vegetal producido en el laboratorio.

Aclimatación de plantas producidas mediante la técnica *in vitro*

Los cultivos bajo invernadero han tomado gran importancia, por las múltiples ventajas, tanto económicas como culturales, que ofrecen, como preservación del suelo y su estructura, condiciones climáticas controladas, mayor calidad de frutos y flores, control fitosanitario más efectivo, eficiencia productiva y mejor aprovechamiento del uso del agua. La producción *in vitro* de plantas es una técnica que se ha venido implementando cada vez más, debido a la variación de las condiciones climáticas, por lo tanto, es necesario buscar y

adoptar diferentes alternativas de producción vegetal, enfocadas en la obtención de especies de importancia agronómica y ambiental.

Las plantas micropropagadas a través de técnicas biotecnológicas, durante la etapa del cultivo *in vitro*, poseen características anatomorfológicas que las diferencian de las plantas propagadas en ambientes naturales. Una plántula en condiciones *in vitro* no tiene necesidad de desarrollar sus funciones fotosintéticas, debido a que toma la energía del medio de cultivo en el cual vive, es decir, no tiene activado su aparato fotosintético para capturar el CO₂, fabricar sus propios asimilados y desarrollarse por sí sola. A esta característica se le denomina *heterótrofa*, esto es, que para vivir depende de otro. Las plantas propagadas en medio natural son autótrofas desde sus primeros momentos (Molina et al., 2008).

Condiciones de adaptación *ex vitro*

Una de las fases de producción de plantas por la técnica *in vitro* contempla la adaptación *ex vitro*, o aclimatación de plantas a condiciones de invernadero. Esto permite que las plantas realicen su transición hacia la activación de su sistema fotosintético y la conexión de su sistema radicular con los haces vasculares. En esta etapa, es de vital importancia controlar los cambios físicos de manera gradual, para evitar estrés por deshidratación o cambios bruscos de temperatura que puedan ocasionar una pérdida considerable de material vegetal, por lo que contar con un área de aclimatización o invernadero que permita mantener condiciones de humedad, temperatura y luminosidad controladas favorecerá el proceso de aclimatación, lo que reduce las pérdidas y mejora los porcentajes de supervivencia según la especie.

A continuación, se pueden evidenciar las condiciones y el proceso de adaptación de las plántulas, una vez salen del laboratorio, con miras a su aclimatación o endurecimiento, o rusificación, para ser llevadas finalmente a campo (figura 70).

Material vegetal *in vitro*. Selección de plántulas con buen desarrollo vegetativo y radicular

Alistamiento: las plantas deben ser retiradas del frasco, procurando mantener su estructura y sistema radicular completo.



Hidratación: el material vegetal debe permanecer en constante hidratación. Es necesario lavar cuidadosamente las raíces y eliminar totalmente cualquier residuo del medio de cultivo.



Sustrato: brinda soporte e hidratación a las plántulas, por lo que debe ser preferiblemente estéril o aséptico. Pueden emplearse bandejas de germinación, vasos, bolsas, etc. El tamaño de las cavidades debe ser proporcional a la especie que se esté trabajando.



Siembra: se realiza sobre las bandejas de germinación o el contenedor seleccionado, procurando no dañar el sistema radicular y evitando la deshidratación de las plantas.



Humedad relativa (HR): Después de la siembra, las plantas deberán mantenerse en una cámara húmeda, al 90 % de HR. La temperatura dependerá de la especie y se usará una iluminación de 16 horas luz.



Bajo estas condiciones físicas, las plantas se mantendrán por una o dos semanas. Este tiempo puede variar en especies de lento crecimiento.



La adaptación empezará de forma gradual y se irán cambiando paulatinamente las condiciones físicas, hasta obtener plantas totalmente endurecidas y autótrofas.



Figura 70. Procedimiento fase de adaptación *ex vitro*.

Fotos: Cristian Rodríguez

Adaptación de plantas *in vitro* a condiciones de invernadero

Durante la fase de aclimatación del material vegetal, es importante mantener las condiciones físicas adecuadas para dar continuidad al crecimiento de las plantas. Estas deben ser evaluadas continuamente para caracterizar su proceso de adaptación a condiciones externas. La temperatura no deberá variar significativamente con respecto a la establecida en cada una de las etapas de producción *in vitro*. También se debe tener en cuenta que, en los contenedores o frascos de vidrio, las plantas se conservan en un alto porcentaje de humedad, que deberá mantenerse durante la primera fase de endurecimiento.

En esta etapa, en la que el sustrato inicialmente no aporta ningún tipo de nutriente a las plantas, se considera de gran importancia establecer un plan de fertilización, siguiendo las recomendaciones de un ingeniero agrónomo, que garantice la disponibilidad de elementos tanto mayores como menores para el material vegetal, y que se inicie la activación fisiológica y autotrófica de las plantas. También es habitual el uso de microorganismos benéficos (hongos micorrizógenos) durante la adaptación *ex vitro* de las plantas, como agentes controladores de problemas fitosanitarios y promotores de crecimiento.

En estudios como el de Valderrama et al. (2008), se obtuvieron porcentajes de supervivencia de plantas de seis genotipos de mora (*Rubus glaucus*), en la fase de aclimatación *ex vitro*, de entre 90 y 95 %. Se usó como sustrato turba con micorriza, y se mantuvo el material vegetal en cámara húmeda y bajo invernadero por dos semanas, a una temperatura de 22 °C. Se efectuaron fertilizaciones foliares una vez por semana con elementos mayores (N, P, K; 10/52/10), y se complementó con elementos menores hasta la quinta semana con aplicaciones de *Trichoderma koningiopsis* Th003 (1×10^6 conidios/ml por cada aspersión foliar).

Otra especie de interés agrícola que presenta rápida y fácil aclimatación en invernadero es la uchuva (*Physalis peruviana*), cuyas plántulas, al realizar la transición a condiciones *ex vitro*, por tratarse de una especie de rápido crecimiento, mostraron un porcentaje de supervivencia cercano al 99 %. El desarrollo de primordios foliares se evidencia en menos de una semana, y las nuevas hojas garantizan la apertura y cierre de estomas, lo que evita la deshidratación de las plantas. Adicionalmente, las hojas que emergen después de la fase *in vitro* ya ejercen la función de transformación de la energía por medio de la fotosíntesis, pues la planta inicia la captura de CO₂ y fisiológicamente dejará de ser heterótrofa (Suárez et al., 2006).

Para la aclimatación de especies leñosas, como sucede con el roble (*Tabebuia rosea* [Bertol.] DC.), en la mayoría de los casos se hace necesario realizar ajustes en las etapas *in vitro* y *ex vitro*, para incrementar los porcentajes de supervivencia del material. Un trabajo realizado por Suárez et al. (2006) evaluó la fase de aclimatación *ex vitro* de plántulas de roble (*Tabebuia rosea* [Bertol.] DC.), las cuales provenían de una fase de enraizamiento previa, utilizando cuatro concentraciones diferentes de ácido naftalenacético (ANA) como regulador de crecimiento vegetal, lo que indujo el desarrollo de raíces adventicias hasta en el 100 % de los explantes expuestos a la mayor concentración hormonal.

Aunque en la mayoría de los casos se busca pasar directamente de la multiplicación a la transferencia *ex vitro*, como una forma de ganar eficiencia, la producción de raíces afecta significativamente las posibilidades de recuperación de especies leñosas perennes en el estado de enraizamiento de la micropropagación. Estudios realizados por Suárez et al. (2006) mostraron la necesidad de aplicar un suplemento de auxina para inducir e incrementar los porcentajes de enraizamiento, alcanzar un mayor número de raíces por explantes y lograr la proporción entre el número de raíces producidas y la concentración de ANA aplicada (Suárez et al., 2006).

Para otras especies leñosas se han utilizado metodologías de adaptación que consisten en impregnar las bases de los tallos en soluciones con altas concentraciones de auxinas, lo que logra un efecto generador de raíces hasta en 80 % de los explantes o esquejes utilizados.

En ensayos de aclimatación de plantas de arándanos (*Vaccinium myrtillus*) provenientes de cultivos *in vitro*, en los que se conoce que en esta etapa los procesos de enraizamiento no son tan efectivos, ya que se han encontrado porcentajes por debajo del 45 % de los explantes expuestos a diferentes concentraciones y reguladores, se han debido considerar alternativas para inducir el desarrollo radicular con el uso de extractos vegetales, tanto en la fase de enraizamiento *in vitro* como durante la transición a fase de invernadero, en condiciones controladas, siendo esta una alternativa eficiente para obtener plantas con mayor desarrollo radicular antes de ser llevadas a campo. Cabe resaltar que, de acuerdo a un análisis descriptivo, se determinó que, en plántulas que no superan los 3 cm de altura, el desarrollo de raíces es significativamente menor, si se compara con explantes de mayor tamaño (figura 71).

El desarrollo radicular de especies arbustivas en condiciones *in vitro* está determinado por diferentes factores fisiológicos y por la capacidad de los tejidos vegetales para responder a una inducción hormonal, ya sea natural o suministrada en el medio de cultivo utilizado en cada una de las fases de crecimiento.

La estimulación de raíces en etapa de laboratorio (*in vitro*) no siempre es un factor determinante para que la plántula se desarrolle en condiciones de invernadero (*ex vitro*). En casos como el de los arándanos, en los que las plántulas son llevadas a etapa de aclimatación sin raíz, se logró desarrollar en esta etapa, un sistema radicular fibroso y superficial (figura 71), característico de esta especie.



Figura 71. Planta de arándano producida *in vitro*, con tres meses de adaptación en invernadero, lista para ser entregada y llevada a campo.

Foto: Sandra Valbuena

Criterios de calidad de los inventarios entregados al cliente final

Uno de los elementos más importantes que se debe tener en cuenta al momento de establecer un cultivo en condiciones de campo es la semilla. La calidad de esta permitirá disminuir el riesgo de problemas sanitarios que puedan ser limitantes para el desarrollo de las plantas. Para asegurar su vigor y buen comportamiento durante el crecimiento y desarrollo en condiciones de campo, el material vegetal que se produce bajo condiciones semicontroladas debe cumplir con los criterios de calidad física, fisiológica, genética y sanitaria. Por esta razón, durante el proceso de producción, aclimatación y acondicionamiento del material, es indispensable hacer un seguimiento continuo de las plántulas, para garantizar su trazabilidad en el sistema de propagación. Estos criterios se deben considerar desde cuatro dimensiones, las cuales se describen a continuación.

Sanidad

La sanidad vegetal está definida como la salud de las plantas para la producción de alimentos (Food and Agriculture Organization [FAO], 2021), razón por la cual, durante el proceso de producción, aclimatación y acondicionamiento del material, se hace un monitoreo constante de las plántulas, de acuerdo con la etapa del proceso en el que se encuentren. Las dos grandes etapas son *en condiciones de laboratorio* y *en invernadero*.

Etapas en condiciones de laboratorio

Durante el proceso de producción bajo condiciones de laboratorio, el material vegetal puede presentar, especialmente, problemas sanitarios asociados a enfermedades. Si al momento de realizar el monitoreo se presentan síntomas de pudriciones blandas, pudriciones acuosas, micelio, clorosis, necrosamiento, hiperhidratación de tejidos u oxidación, entre otros, se tomará la decisión de eliminar el material contaminado, considerando la cantidad de material total disponible.

Cuando el material vegetal en producción es suficiente, es posible descartar las plántulas contaminadas y continuar el proceso con aquellas que presenten las mejores características, pero si, por el contrario, la cantidad de material es limitada, se debe definir la implementación de técnicas de limpieza fitosanitaria. En la tabla 24, se describen las técnicas a considerar.

Tabla 24. Descripción, ventajas y desventajas de las técnicas de limpieza fitosanitaria en condiciones de laboratorio

Técnica	Características	Ventajas	Desventajas
Siembra de meristemas.	Eliminación de patógenos virales (Margara, 1988). Uso de medios de cultivo de acuerdo con la especie vegetal a propagar.	Alta tasa de multiplicación.	En algunos casos, no hay eliminación total de la presencia de virus.
Termoterapia.	Erradicación de patógenos causantes de enfermedades (Varés Megino, 2009). Uso de altas temperaturas (Heredia Guerrero, 2016). Aplicación de diferentes temperaturas para eliminar problemas sanitarios.	Menor costo para la implementación de esta técnica. Puede ser empleada conjuntamente con la siembra de meristemas.	Pérdida de material vegetal. Se requiere el uso de equipo especializado (cámara climática).
Quimioterapia.	Adición de antivirales y sustancias químicas a los medios de cultivo (Heredia Guerrero, 2016).	En algunos casos, limpieza del 100 % de la carga viral.	Mayor costo por el uso de productos químicos.
Crioterapia.	Exposición de los medios de cultivo a temperaturas de ultracongelación (Méndez Chávez, 2014).	Obtención de material vegetal libre de virus.	Estandarización de protocolos por especie. Altas tasas de pérdida de material vegetal.

Fuente: Elaboración propia

Una vez definida e implementada la técnica de limpieza del material, se continuará con el monitoreo sanitario de las plántulas para asegurar su calidad.

Eta­pa en condiciones de invernadero

Cuando las plántulas finalizan el periodo en condiciones de laboratorio, son llevadas a invernadero para iniciar el proceso de aclimatación. En esta etapa, se debe tener claro el manejo agronómico que se le dará a las plántulas, el cual dependerá de la especie vegetal a trabajar. El manejo agronómico deberá contemplar lo descrito en la tabla 25.

Tabla 25. Consideraciones para el manejo agronómico de las plántulas en condiciones de invernadero

Labor	Consideraciones
Siembra.	Tipo de sustrato. Distancia de siembra (cuando es en camas). Tipo de bandeja germinadora.
Fertilización.	Dosis. Frecuencia. Tipo (foliar o edáfico).
Riego.	Tipo de riego (goteo o aspersión). Tiempo de riego. Frecuencia (diario, dos veces a la semana, semanal).
Manejo de enfermedades.	Monitoreo semanal. Identificación de síntomas*. Aplicación preventiva de productos biológicos** para el manejo de patógenos. Aplicación curativa de productos químicos** para el control de enfermedades. Descarte de material cuando se trata de enfermedades limitantes para la producción.
Manejo de plagas.	Monitoreo semanal. Identificación de signos*. Aplicación preventiva de productos biológicos** para el manejo de insectos plaga. Aplicación curativa de productos químicos** para el control de insectos plaga. Descarte de material cuando el daño producido por los insectos es limitante para la producción.
Cosecha.	Selección de plántulas que cumplan con el vigor y desarrollo para el trasplante a sitio definitivo.

* Los síntomas o signos de problemas fitosanitarios deben ser consultados antes del inicio del proceso de multiplicación, teniendo en cuenta que esto dependerá del material vegetal que se trabajará.
** Deben cumplir con el registro ICA.

Fuente: Elaboración propia

Por medio del manejo agronómico en etapa de invernadero, se asegura la etapa de aclimatación y el buen desarrollo de las plántulas, para luego ser trasplantadas a campo, según el caso. Asimismo, a través del monitoreo y seguimiento constante se identifican a tiempo los problemas sanitarios, con el fin de determinar si es necesario el descarte o la implementación de estrategias como podas sanitarias, o aplicación de productos biológicos o químicos para disminuir la proliferación de aquellos —o para su total erradicación—.

Calidad fisiológica

Este criterio de calidad corresponde a la capacidad que tienen las plantas para producir un nuevo individuo de acuerdo con las funciones propias de la especie vegetal y con el tipo de semilla (Becerra Campiño et al., 2019). Para el caso del proceso de producción, aclimatación y acondicionamiento, este criterio se evalúa específicamente en la etapa de laboratorio, por medio de la tasa de multiplicación, la cual dependerá de la especie vegetal y de sus características al momento de la introducción.

Calidad física

La calidad física de las plántulas contempla el vigor y buen comportamiento de estas durante el proceso de producción, aclimatación y acondicionamiento (Garay, 1991; Becerra Campiño et al., 2019). Es decir, que, desde el momento de la introducción del material hasta la entrega de inventarios al cliente final, se debe garantizar:

- Ausencia de daños mecánicos de las plantas.
- Ausencia de síntomas y signos causados por problemas fitosanitarios.
- Pureza de la semilla/material vegetal.
- Buen desarrollo de los meristemas en condiciones de laboratorio.
- Óptimo desarrollo de las plantas en condiciones de invernadero.

Calidad genética

Este último criterio de calidad para el proceso de producción, aclimatación y acondicionamiento del material vegetal está directamente relacionado con las características de desarrollo de la planta de acuerdo con su morfología, y debe contemplarse desde el momento en el que se colecta el material que será introducido inicialmente al laboratorio, para lograr la trazabilidad del proceso. Es decir que este criterio corresponde a la autenticidad y estabilidad que

tiene el material vegetal respecto a las características definidas al momento de su liberación (Terenti, 2004; Becerra Campiño et al., 2019).

Además de los criterios anteriormente descritos, se deberán cumplir las condiciones pactadas con el cliente final para la entrega del material vegetal, las cuales pueden incluir:

- Altura de la plántula.
- Número de hojas.
- Sistema radicular.
- Tipo de sustrato.
- Embalaje.
- Informe de manejo de las plántulas aclimatadas y diagnóstico sanitario de estas.

Conclusiones

La biotecnología se ha convertido en una herramienta robusta que ha permitido a la sociedad avanzar en técnicas sostenibles para la producción de alimentos. Los efectos —cada día más adversos— del cambio climático han generado una alta vulnerabilidad de los sistemas de producción de alimentos, lo que obliga a la sociedad a buscar estrategias para intensificar de manera sostenible su producción. Por lo tanto, las técnicas de producción *in vitro* son una herramienta que permite a los productores acceder a material vegetal con altos estándares de calidad física, fisiológica, genética y sanitaria. Lo anterior puede considerarse una estrategia de adaptación al cambio climático, ya que con material vegetal de mayor calidad se puede hacer frente a condiciones de estrés biótico y abiótico que pueden limitar la producción de alimentos y la seguridad alimentaria de una región.

Referencias

- Becerra Campiño, J. J., Rodríguez Yzquierdo, G. A., Alzate Henao, S. V., Miranda Salas, T. C., Tibadui-za Castañeda, L. P. & Cañar Serna, D. Y. (2019). *Manual técnico para la producción de semilla de plátano Hartón Llanero en los Llanos Orientales*. AGROSAVIA. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7403206>
- Garay, A. E. (1991). La calidad de la semilla y sus componentes. En M. A. Irastorza (Coord.), *Control de calidad en el campo, beneficio y almacenamiento* (pp. 1-12). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Disponible en: https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/55667/SB117.C65_Control_de_Calidad_1991..pdf?sequence=1

- Gil Rivero, A. E., López Medina, S. E y López Zabaleta, A. (2017). Aclimatación de plántulas *in vitro* de *Saintpaulia ionantha* (Gesneriaceae) "violeta africana" a condiciones de invernadero. *Arnaldoa*, 24(1), 343-350. <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v24n1/a16v24n1.pdf>
- Heredia Guerrero, S. C. (2016). Erradicación de onion yellow dwarf virus (OYDV) en cebolla Shallot (*Allium cepa* var. *Aggregatum*), mediante el cultivo de meristemas, quimioterapia y termoterapia para la producción de bulbos libres de virus. [Trabajo de grado, Universidad San Francisco de Quito]. USFQ Repositorio Digital. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/230000/5198/1/124560.pdf>
- Margara, J. (1988). *Multiplicación vegetativa y cultivo 'in vitro'*. Mundiprensa.
- Méndez Chávez, M. (2014). Evaluación del efecto de la aplicación de métodos criogénicos sobre el saneamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar (*sugarcane mosaic virus*, SCMV). [Tesis de maestría, Universidad Veracruzana]. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/49249/MendezChavezManuel.pdf?sequence=1&isAllowed=y#>
- Molina, L. A., González Olmedo, J. L., Fundora, Z., Abdunour J. (2008). Aclimatización *in vitro* y *ex vitro*: una estrategia para mejorar la productividad de la micropropagación de plantas. *Revista Revive. Biotecnología*, 15. https://www.researchgate.net/publication/311736525_Aclimatizacion_in_vitro_y_ex_vitro_una_estrategia_para_mejorar_la_productividad_de_la_micropropagacion_de_plantas_Revista_Revive_Biotecnologia_Bolivia_15_2008
- Oliveira, L. S., Dias, P. C., & Brondani, G. E. (2013). Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesq. flor. bras.*, 33(76), 439-453. <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/481/342>
- Food and Agriculture Organization [FAO]. (2021). *Agrovoc Multilingual Thesaurus*. https://agrovoc.fao.org/browse/agrovoc/en/page/c_25398?clang=es
- Resende, C. F., Bianchetti, R. E., Oliveira, M. S. de, Braga, V. F., & Peixoto, P. H. P. (2015). *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. *Revista Ciencia Agronómica*, 46(3), 582-589. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150041>
- Sánchez, L. A., Saavedra, D., & Romero, H. (2012). Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Palmas*, 33(4), 41-52. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/10739/10726>
- Suárez, E. I., Jarma, J. A., & Ávila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC.). *Temas Agrarios*, 11(2), 52-62. <https://doi.org/10.21897/rtav11i2.645>
- Terenti, O. (2004). *Calidad de semilla, qué implica y cómo evaluarla*. Sitio Argentino de Producción Animal. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/27-calidad_semillas.pdf
- Valderrama, A. M., Álvarez, R., Barrero, L. S., Robayo, M., & Núñez, V. (2008). Validación y escalamiento de plántulas de mora 'in vitro' y manejo 'ex vitro' para entrega a agricultores de Silvania. En L. S. Barrero (Ed.), *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado* (pp. 64-75). Corpoica.