

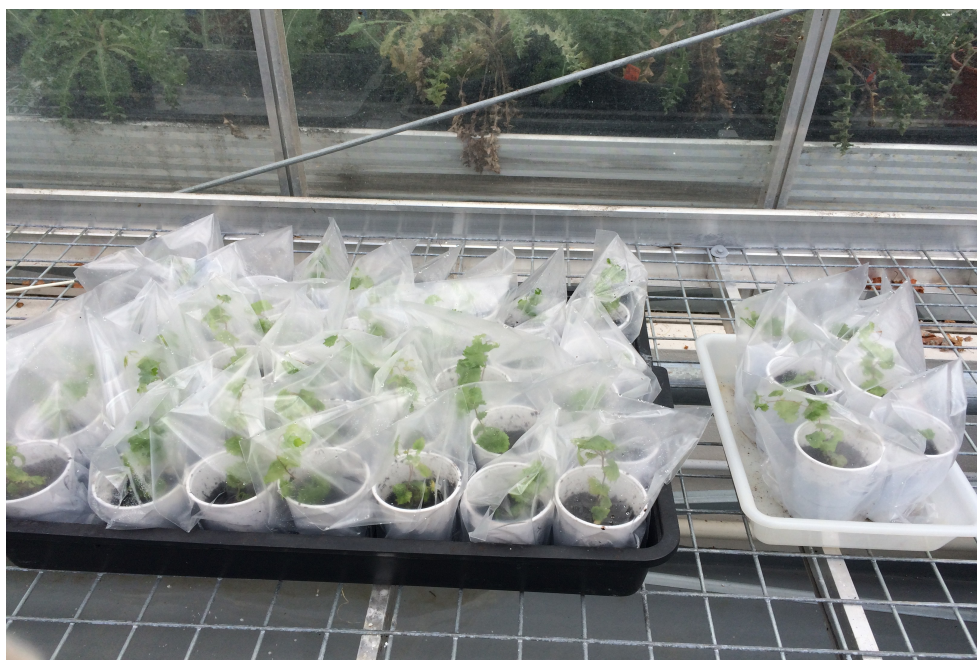


**Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**TRABAJO FIN DE GRADO:
ALGUNAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE
PLANTAS DE VID VAR. PEDRO XIMÉNEZ EN EL
PROCESO DE ACLIMATACIÓN AL EXTERIOR TRAS SU
PROPAGACIÓN IN VITRO.**

GRADO DE INGENIERÍA AGRÍCOLA



José Agustín Tovar Mendoza

Fecha de entrega: 12/05/2016

Autor:

José Agustín Tovar Mendoza.
Grado en Ingeniería Agrícola.
Trabajo fin de grado realizado en el Instituto de Recursos
Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC).

Fdo. Dr. D. Manuel Cantos Barragán.
Dpto. Biotecnología Vegetal.
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de
Sevilla (IRNAS) (CSIC).

Fdo. Dr. Jesús Cambrollé Silva.
Dpto. Biología Vegetal y Ecología.
Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

Fdo. Dra. Ana María Morales Sillero.
Dpto. Ciencias Agroforestales.
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica. Universidad de Sevilla.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (I.R.N.A.S.), por permitirme realizar este proyecto.

Al Dr. D. Manuel Cantos Barragán, Científico Titular del C.S.I.C. (I.R.N.A.S.) por su profesionalidad, por su trato cercano, su ayuda y sus consejos, por su interés y dedicación, pues sin él este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. D. Jesús Cambrollé Silva por su ayuda en la técnica de determinación de intercambio gaseoso del material vegetal, sus consejos, su interés y dedicación.

A la Dra. Dña. Ana M^a Morales Sillero, Profesora Contratada del Departamento de Ciencias Agroforestales, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por sus consejos.

A Dña. M^a del Mar Parra Alejandre, Ayudante de Investigación del C.S.I.C. (I.R.N.A.S.), por todos sus consejos, su profesionalidad y su inestimable ayuda.

Al Dr. D. José Luis García Fernández, Titulado Superior Especializado del C.S.I.C. (I.R.N.A.S.) por su tiempo y su ayuda, que han sido fundamentales en este trabajo.

Especialmente a mis padres, Maritza y José, a mi hermana Lisset y a mi amiga Bárbara, por estar presentes en todo momento demostrándome su cariño, ánimo y apoyo incondicional.

ÍNDICE

1. Introducción.	1
1.1 Cultivo <i>in vitro</i>	1
1.1.1. Medio VID.	1
1.2 Aclimatación.	2
1.2.1. Efectos de cultivo <i>in vitro</i> en la planta y estrés en la adaptación al exterior.	2
a) Eficiencia fotosintética.	2
b) Funcionamiento de los estomas.	3
c) La cutícula.	3
d) Anatomía.	4
e) Hiperhidricidad.	5
f) Desarrollo de compuestos volátiles en el interior del recipiente.	6
g) Las hojas persistente.	6
h) Las hojas nuevas.	7
1.2.2. Proceso de aclimatación.	9
a) Aclimatación <i>in vitro</i>	9
b) Control ambiental.	10
c) Antitranspirantes.	10
1.3. La Vid.	11
1.3.1. El cultivo <i>in vitro</i> en la vid.	11
1.4. Variedad Pedro Ximénez.	12
1.5. Método de evaluación de los efectos del estrés ambiental. Valoración de tolerancia.	13
2. Objetivos.	15
3. Material y Métodos.	16
3.1. Material Vegetal.	16
3.2. Propagación <i>in vitro</i> del material.	16
3.2.1. Parámetros a evaluar.	18
3.3. Aclimatación a condiciones externas.	19
3.4. Parámetros biométricos.	21
3.5. Parámetros bioquímicos.	22
3.6. Intercambio gaseoso.	23
3.7. Tratamientos estadísticos.	24
4. Resultados.	25
4.1. Micropropagación de los individuos.	25
4.2. Adaptación a condiciones externas.	28
4.2.1. Respuesta de los individuos tras 45 días de cultivo <i>in vitro</i>	28

4.3. Evolución de la pérdida del contenido del agua.	29
4.4. Pigmentos fotosintéticos.	34
4.5. Intercambio gaseoso.	35
5. Discusión.	37
6. Conclusiones.	41
7. Bibliografía.	42

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Cultivo *in vitro*.

El término cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, engloba un conjunto de técnicas que permiten el desarrollo del material vegetal (plantas, semillas, embriones, órganos, células y protoplastos) sobre un medio nutritivo, en ambiente aséptico, y en un espacio definido, cerrado y con unas condiciones ambientales controladas (Pierik, 1990). Este proceso es viable gracias a la autonomía y totipotencia de la célula vegetal.

Entre las ventajas del cultivo *in vitro* destacan:

- El desarrollo del material vegetal en un espacio relativamente pequeño, donde se optimizan los factores físicos, nutricionales y hormonales, con exclusión de gran parte de los microorganismos (hongos y bacterias), así como también de las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos).
- La obtención de individuos durante todo el año, consiguiéndose elevadas tasas de multiplicación en poco tiempo y con escaso material de partida.

En consecuencia, la finalidad de cualquier técnica de cultivo *in vitro* es controlar el crecimiento y desarrollo del explanto manipulando su entorno. Los factores que determinan el éxito de esta técnica son el material vegetal, el medio de cultivo y las condiciones ambientales asépticas.

Por otro lado, la técnica de cultivo *in vitro* es un buen complemento para los estudios *ex vitro*, debido a que la planta suele mostrar respuestas similares a las presentadas en condiciones de cultivo en invernadero o campo (Sivritepe y Eris, 1999; Cavagnaro y cols., 2006; Hamrouni y cols., 2008).

1.1.1. Medio VID.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vitro* o *in vivo*.

También se deben añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos, también denominados propágulos o explantos) no son completamente autótroficas cuando se desarrollan en estas circunstancias.

Un explanto de vid, aislado *in vitro* y que crece y se desarrolla, necesita muchas sustancias (agua, agar, azúcar, nutrición mineral, reguladores de crecimiento, vitaminas). Se puede observar que algunas de estas sustancias son también necesarias para el desarrollo *in*

vivo.

Si no se añade al medio ningún agente gelificante como el agar, se denomina medio líquido, en lugar de sólido, que es el medio solidificado con agar.

1.2. Aclimatación.

1.2.1. Efectos del cultivo *in vitro* en la planta y estrés en la adaptación al exterior.

Las condiciones especiales durante el cultivo *in vitro* promueven el rápido crecimiento y la multiplicación de los brotes, y a menudo causan efectos en la formación estructural de las plantas haciéndolas fisiológicamente, e incluso morfológicamente anormales.

Con frecuencia se caracterizan por una mala eficiencia fotosintética, un mal funcionamiento de los estomas y una marcada disminución en ceras epicuticulares. Además, las ceras presentes en la superficie de las hojas de plantas cultivadas *in vitro* pueden variar.

Las condiciones en las que se realiza el cultivo *in vitro* comportan una humedad relativa alta y baja irradiancia. Por otro lado, factores como los niveles de CO₂, riqueza en sacarosa y nutrientes contenidos en el medio, pueden contribuir a una drástica caída en la supervivencia bajo las nuevas condiciones ambientales una vez las plantas son colocadas directamente en un invernadero o en campo.

La comprensión de estas anomalías es un requisito previo para desarrollar protocolos de trasplante eficientes. A continuación se presenta un resumen de las principales anomalías en cultivo *in vitro* de plantas.

a) Eficiencia fotosintética.

Para el crecimiento *in vitro* se requiere un suministro continuo de hidratos de carbono exógenos, generalmente sacarosa (2-3%), como fuente de carbono. Esta situación se debe a que el explanto, de muy pequeño tamaño, no tiene el soporte enzimático suficiente para realizar la fotosíntesis convenientemente (estado de mixotrofia) por lo que hay que suministrarle el producto final de la fotosíntesis para su normal formación de biomasa. Aunque las plántulas pueden parecer normales, es poco probable que la función fotosintética se realice convenientemente. Por lo tanto, *in vitro*, las plantas son pobres en contenidos de pigmentos fotosintéticos o de las enzimas implicadas en la fotosíntesis. Así, la Ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBP) es inactiva o ausente.

No obstante, la acumulación de clorofila b y la capacidad fotosintética se ven favorecidos por el suministro de azúcar. La adición de azúcar evita la aparición de fotoinhibición (Hazarika et al., 2000b, 2004; Hazarika, 2003a, 2003b; Wainwright and

Scrace, 1989). La capacidad fotosintética es considerablemente mayor en presencia que en ausencia de azúcares y esto podría aumentar la capacidad de utilizar la luz absorbida. Sin embargo, este efecto se contrarresta, en parte, por el alto contenido de clorofila de las plántulas de alto suministro de luz, la cual aumenta la absorción de energía. Un suministro de carbohidratos adecuado en las plántulas con alto régimen lumínico (3%) podría permitirles mantener los múltiples mecanismos de protección y reparación, reduciendo así el riesgo de fotoinhibición. Parte de este efecto podría ser debido a la tasa de crecimiento mejorada, que ayuda a reemplazar fotosistemas deteriorados y consumir un excedente de asimilados (Ticha et al., 1998).

b) Funcionamiento de los estomas.

La función principal de los estomas es la regulación del contenido de agua dentro de la hoja, por lo que una alteración en la estructura morfológica y/o del funcionamiento de los mismos pueden causar la pérdida excesiva de agua, marchitamiento y muerte de la planta. La estructura de los estomas en las plantas *in vitro*, difieren notablemente de las desarrolladas en invernadero o campo (Hazarika, 2006). Autores como Brainerd y Fuchigami, (1982) y Wardle y Short, (1983) han encontrado que las células guarda u oclusivas en las plantas *in vitro* se encontraban levantadas y redondeadas en comparación a la forma elíptica normal.

Los estomas de las plantas cultivadas *in vitro* muestran una incapacidad característica para cerrarse al ser transferida la planta al campo o al invernadero. El tamaño de la abertura estomática es controlado por el volumen relativo de las células oclusivas, dependiendo de la turgencia, que a su vez depende de la presión osmótica vascular y el potencial hídrico. La ausencia de control estomático podría deberse a propiedades anormales de la pared celular o a la inadecuada función de los protoplastos.

Ziv y cols., (1987) concluyeron que ese fracaso de las células oclusivas al no contraerse en soluciones hipertónicas son debido a los defectos de la pared celular y se correlacionó con la orientación anormal de las microfibrillas de celulosa.

c) La cutícula.

La cutícula es una capa superficial no celular, secretada por la epidermis y compuesta de una matriz de cutina junto con ceras incrustadas y ceras de superficie que cubren externamente los tejidos aéreos de la planta.

La función principal de la cutícula es limitar la pérdida de agua por transpiración. La permeabilidad al agua a través de la cutícula es influida principalmente por la estructura y la cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares. La deposición escasa de cera protectora epicuticular en la superficie de las hojas de las plantas cultivadas *in vitro*, se ha considerado

como uno de los factores más importantes responsables de la pérdida excesiva de agua, lo que lleva al fracaso del trasplante (Martin and Juniper, 1970).

En diferentes estudios la medición de la cantidad de cera epicuticular en hojas de plantas cultivadas *in vitro* reveló una falta de estructura cristalina, que se correlacionó significativamente con una menor cantidad de ceras epicuticulares en comparación con las plantas cultivadas en invernadero (Fuchigami et al., 1981; Hazarika et al., 2000a, 2000c, 2001a, 2002a; Wetzstein and Sommer, 1982).

La naturaleza química de la cera depositada sobre la superficie de las hojas en condiciones *in vitro* también se sabe que difiere de la que se forma en condiciones naturales, permitiendo una difusión excesiva de agua a través de las hojas *in vitro* (Sutter, 1984).

Las plantas micropropagadas alcanzan una densidad de cera comparable a las plantas que crecen en el campo, en 6-7 semanas del trasplante (Dhawan y Bhojwani, 1987). Estas observaciones corroboran las realizadas sobre la tasa de pérdida de agua de las hojas en diferentes etapas de la micropropagación y el endurecimiento (Hazarika, 2006). El descenso en la tasa de pérdida de agua coincide con el aumento de la cantidad de cera depositada sobre las hojas (Wardle y cols., 1983; Sutter y Langhans, 1982; Sutter, 1984).

d) Anatomía.

La pobre diferenciación del mesófilo y el débil sistema vascular de las hojas formadas *in vitro*, hacen que las plantas sean altamente susceptibles al estrés del trasplante. Las hojas de las plantas cultivadas *in vitro* son más delgadas y tienen una capa de células en empalizada característicamente poco desarrollada, con una cantidad significativa de espacio aéreo en el mesófilo en comparación con las plantas cultivadas en invernadero.

Los cambios en la anatomía de la hoja que se producen durante la aclimatación se observan más en las hojas que se desarrollan después del trasplante (Brained y cols., 1981). Las hojas persistentes se hacen más gruesas debido al agrandamiento de las células de empalizada, pero no suele haber ningún cambio en el número de capas de células de empalizada o en la cantidad de espacio de aire en el mesófilo. Durante la aclimatación se observa como hojas procedentes de *in vitro* asumen características intermedias entre las hojas cultivadas *in vitro* y en invernadero o en campo (Fabbri y cols., 1986). Sólo las hojas nuevas que se forman después del trasplante son similares a las hojas de invernadero (Wetzstein and Sommer, 1982; Donnelly et al., 1985).

e) Hiperhidricidad.

Hiperhidricidad (también conocida anteriormente como vitrificación) es un trastorno morfológico y fisiológico de las plantas propagadas vegetativamente *in vitro* (micropropagadas). Las plantas hiperhidratadas, se llaman así porque tienen un aspecto vítreo. Su tallos y hojas son a menudo gruesos, rígidos y fácilmente rompibles. Se caracterizan por una disminución de proteínas, del contenido de clorofila y de los compuestos fenólicos. Por otro lado, aumenta el contenido de agua y la composición de los iones está alterada.

En muchos casos, las hojas hiperhidratadas no tienen células en empalizada, en cambio, sólo tienen un mesófilo esponjoso y en gran medida vacuolado con grandes espacios intercelulares (Vieitez y cols., 1985).

La hiperhidricidad depende de la disponibilidad de agua, del contenido de micronutrientes y el desequilibrio hormonal en los medios de cultivo. Además, el microambiente del recipiente de cultivo y la composición de etileno en el interior del mismo prolongan el efecto de hiperhidricidad.

Los estudios histoquímicos de células oclusivas de las hojas hiperhidratadas revelan niveles más bajos de ligninas, celulosa, pectinas y cutina (Kevers, 1987; Kataeva y cols., 1991). El tamaño, y por consiguiente la función, de las células oclusivas del estoma es controlado por el volumen relativo de agua, es decir, por la turgencia. Las paredes celulares epidérmicas tienen una función reguladora en el movimiento de los estomas. Su engrosamiento, conformación y composición, así como la orientación de las microfibrillas, contribuyen a su funcionamiento. Defectos estructurales en células oclusivas se asocian con el desarrollo de hojas hiperhidratadas, que carecen o que han perdido constituyentes de la pared celular. Los estudios microscópicos indican que el poro rodeado por las células oclusivas en hojas hiperhidratadas es más redondeado en contraste con el poro elíptico en hojas normales (Ziv y cols, 1987). Aunque los poros de estomas en hojas hiperhidratadas no se cierran en la oscuridad, los protoplastos en las células oclusivas sí responden a la presencia de ácido abscísico (ABA) o en una solución hipertónica, lo que indica que el defecto se encuentra en la pared de las células oclusivas.

Además de la forma anormal de las células oclusivas y, en consecuencia, de los poros de los estomas, las paredes de las células adyacentes a los poros resultan muy dañadas en las células hiperhidratadas. Esto podría ser el resultado del fracaso del proceso de la división celular, así como la deficiencia de las sustancias pécticas y celulosa durante la formación de la pared secundaria (Ziv and Ariel, 1992). Las paredes están soportadas por microfibrillas, orientadas en paralelo al eje longitudinal del poro, es decir, anisotrópicamente. Esta orientación especial controla el movimiento de los estomas, en respuesta a los cambios en la presión de turgencia de las células oclusivas. Una orientación defectuosa y la presencia de callos afectan la función de los estomas en las hojas hiperhidratadas. La formación de callo puede estar afectada por la disponibilidad de Ca^{2+} y otros iones (Kauss, 1987), causando un engrosamiento de la pared celular.

f) Desarrollo de compuestos volátiles en el interior del recipiente.

Los recipientes de cultivo cerrados se utilizan con el fin de evitar la contaminación. A veces, pueden causar un crecimiento anormal de la planta debido a la acumulación de gas, tal como etileno. El etileno es un regulador de crecimiento de las plantas producido por los tejidos, callos y las propias plántulas para regular la morfogénesis *in vitro* y puede provocar la descomposición de la clorofila, llevando a la senescencia y caída de la hoja (Adkins, 1992). En consecuencia, el exceso de acumulación de gas etileno en el recipiente cerrado puede inhibir el crecimiento de plantas y reducir la disponibilidad de oxígeno para la respiración. El etileno también produce una menor formación de raíces. Por otro lado, esta acumulación excesiva de etileno en las últimas etapas del desarrollo *in vitro* podría ser uno de los principales factores causantes de la hiperhidricidad (Sung y Huang, 2000).

De los factores expuestos, se pueden sugerir algunas actuaciones para paliar la hiperhidricidad en el cultivo *in vitro*, como la reducción de la humedad relativa, fomentar un buen intercambio de gases a través del recipiente de cultivo, aumentar la concentración de agar en los medios, o el uso de absorbentes de etileno y ventilación forzada.

g) Las hojas persistentes.

Las hojas que se desarrollaron en los recipientes *in vitro* y persisten después del trasplante, pueden permanecer desde una semana a varios meses antes de entrar en senescencia, dependiendo de la especie de planta y el grado de estrés ambiental experimentado *ex vitro*. Estas hojas persistentes aumentan de tamaño ligeramente, principalmente por elongación celular. Superado este período, en la mayoría de los casos, los estomas han adquirido ya la función de cierre.

El papel de las hojas persistentes es un tema muy importante (Brained y cols., 1981; Sutter, 1988; Wetzstein y Sommer, 1982). La capacidad fotosintética varía según la especie, lo que puede determinar la contribución *ex vitro* de las hojas persistentes. Las plantas cultivadas se pueden dividir en especies competentes y no competentes fotosintéticamente. En el grupo de las no competentes, las hojas se deterioran rápidamente tras el trasplante y contribuyen sólo con los nutrientes que restituyen de nuevo a la planta; tales hojas se consideran como órganos de almacenamiento.

Las hojas de las especies competentes no se deterioran rápidamente después del trasplante, convirtiéndose en respiraderos y sumideros de fotoasimilados de las nuevas hojas tras aproximadamente un mes en condiciones *ex vitro*.

h) Las hojas nuevas.

Los fenotipos de las nuevas hojas formadas *ex vitro* varían según la especie, los ambientes de cultivo y trasplante. Las hojas nuevas de especies no competentes, se forman la segunda semana después del trasplante (Grout y Aston, 1977b). Sin embargo, las nuevas hojas de especies competentes son de transición haciéndose progresivamente más grandes, con estomas funcionales y mejor capacidad de absorción de CO₂. El número de hojas de transición producidos tras un trasplante puede depender del número de brotes de hojas inmaduras formadas en cultivo (Donnelly y Vidaver, 1984a).

Por otro lado, las raíces que se han originado *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo* (no tienen, o tienen pocos pelos radicales) (Hazarika, 2003); por lo que hoy en día la mayoría de los autores (Singh y Shymal, 2001) mantienen que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas. Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vitro* se haga más difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración (Hazarika, 2003). En consecuencia, es de vital importancia que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible, cuando pasan a condiciones *in vivo*.

Para paliar este problema se pueden acometer algunas actuaciones, algunas de ellas necesarias, como:

- Transferir la raíz completa al suelo.
- Bañar los tallos, si no existe la raíz en una solución de auxina, inmediatamente antes de que vaya a desarrollarse el enraizamiento, para facilitar la formación de raíces.
- El agar (que lleva azúcar) debe ser bien eliminado para evitar infecciones por hongos y bacterias.
- Se debe utilizar suelo esterilizado. El suelo se puede esterilizar con vapor, o también, con mucha eficacia, por radiación gamma. Sin embargo, en la práctica, rara vez se utiliza suelo estéril.
- Aunque las plantas *in vitro* deben venir de condiciones asépticas y, por tanto, libres de plagas y enfermedades, se debe controlar cualquier aparición de éstas (hongos, bacterias, insectos, babosas, etc.), ya que las plantas *in vitro* son generalmente débiles.
- Para evitar hacer daño a las raíces, es recomendable plantar sobre suelo tamizado.

- Para mejorar la aclimatación *ex vitro*, el enraizamiento *in vitro* debería tener lugar en un medio pobre en sales.
- Uso de retardantes del crecimiento:

Los retardantes del crecimiento de las plantas son compuestos químicos (fundamentalmente carbamatos, derivados del ácido fosfónico, análogos de la colina, ácidos succinámicos o maleámicos) que retrasan la activación del meristemo subapical responsable de la elongación de los tallos. En general inducen un acortamiento de los entrenudos de plantas superiores *in vivo* y tienen ciertos efectos adicionales, como la reducción del tamaño de la hoja, la intensificación de la coloración verde de las mismas y engrosamiento de las raíces.

Se pueden utilizar en el medio de cultivo en la micropropagación varios retardantes del crecimiento para reducir el daño debido a marchitamiento sin efectos secundarios perjudiciales. Por ejemplo, la adición de 0,5 a 4 mg/L de paclobutrazol en el medio de enraizamiento reduce el potencial hídrico debido a que reduce las aberturas de los estomas, aumenta la cera epicuticular, acorta los tallos y engrosa las raíces, reduce el marchitamiento después de la transferencia, y también aumenta la concentración de clorofila por unidad de superficie foliar.

- Disminución del grado de humedad en el interior del recipiente:

Una humedad relativa por debajo del 100%, produce un aumento de cera epicuticular, mejora el funcionamiento de los estomas reduciendo la deshidratación de la hoja.

Muchos laboratorios comerciales no realizan la fase de inducción y elongación de raíz *in vitro*, ya que es un trabajo intensivo y costoso. El proceso de enraizamiento *in vitro* se ha estimado que representan aproximadamente el 35 a 75% del coste total de micropropagación (Debergh y Maene, 1981). Además, como se ha descrito, se presentan ciertas anomalías como la alteración de la conexión vascular en la zona de transición entre las raíces y la parte aérea, lo que limita la absorción de agua de la raíz. Incluso en muchas ocasiones, aunque después de la aclimatación, las conexiones vasculares sean más funcionales no mejora la absorción de agua (Sharma y cols., 1999).

El enraizamiento directo de brotes se puede llevar a cabo mediante la inmersión del extremo del brote en ácido indol butírico (AIB) (50 mg/L, durante 30 min) y, posteriormente, la plantación de éste en un suelo. Los tallos enraizados directamente en estas condiciones

suelen mostrar una mayor supervivencia en el campo que las raíces originadas en condiciones *in vitro* (Das y cols., 1990).

1.2.2. Procesos de aclimatación.

Como se viene comentado, las plantas cultivadas en tubos de ensayo tiene generalmente ciertas características fenotípicas que dificultan en gran medida su adaptación a condiciones externas de cultivo, por lo que a las plantas desarrolladas *in vitro* se les debería proporcionar, durante un periodo determinado de tiempo, condiciones que palién esa situación y les permitan aclimatarse, de manera que queden endurecidas para afrontar el nuevo ambiente. Para ello, fundamentalmente se debe mantener durante dicho periodo una humedad relativa alta, bajas irradiancia y temperatura.

Para conseguir este objetivo se practican varias estrategias para la aclimatación.

a) Aclimatación *in vitro*.

Varias técnicas se han propuesto para facilitar la adaptación *ex vitro* centradas en las últimas etapas de la micropropagación con el fin de modificar la fisiología de la planta mediante una mayor eficacia fotosintética o mejor gestión del agua.

La primera estrategia asume que los cultivos autótrofos pueden tener hojas persistentes que viven más tiempo, con lo que se aumentaría la productiva fotosintética *ex vitro* (Grout y Millam, 1985). El objetivo es modificar el fenotipo del cultivo fomentando la autotrofia. Para ello, puede reducirse la concentración de oxígeno en el ambiente del cultivo que ocasiona una reducción de la tasa de la fotorrespiración (Shimada y cols., 1988). Como alternativa, el azúcar se disminuye o se elimina completamente del medio (Kozai, 1988), mientras que el flujo de fotones fotosintéticos (PPF) y la concentración de CO₂ se incrementan (Kozai y cols., 1988). En cuanto al sistema gaseoso se usa un velo de plástico permeable transparente como cierre del recipiente. Este velo mejora el intercambio de gas en el cultivo, enriquece o reduce el contenido en CO₂ y en O₂, aumenta la penetración de luz y disminuye la humedad relativa en el recipiente.

La segunda estrategia asume que las plantas desarrolladas bajo una humedad relativa inferior tendrán menos problemas de transpiración y translocación *ex vitro*, y de que las hojas persistentes se parecen a las hojas normales. La reducción de la humedad relativa *in vitro* se realiza mediante el uso de desecantes, recubriendo el medio con materiales oleosos (Ziv y cols., 1983; Short y cols., 1987), mediante la apertura de recipientes de cultivo en una atmósfera de baja humedad relativa (Brainerd y Fuchigami, 1981), el ajuste del cierre del recipiente del cultivo o el uso de un cierre especial que facilita la pérdida de agua, y por enfriamiento del fondo del recipiente (Vanderschaeghe y Debergh, 1988). En general, la humedad relativa no podría reducirse al 85% sin lesión en el cultivo. Una humedad relativa

del 85% disminuye la tasa de multiplicación, pero aumenta el contenido de proteína y pigmentos, reduce el contenido de agua y mejora la supervivencia *ex vitro* (Ziv y cols., 1983). Al disminuir la humedad relativa en los recipientes del cultivo, los sistemas de transpiración y de translocación mejoraron en las plantas de cultivo, esta mejora estuvo asociada en la absorción de iones minerales a través del gradiente de transpiración (Debergh, 1988a, 1988b).

b) Control ambiental.

Una aclimatación satisfactoria del invernadero de adaptación proporciona unas condiciones óptimas para una mayor supervivencia y un mejor crecimiento posterior de plantas micropropagadas. Tradicionalmente, el entorno para la aclimatación de plantas procedentes de *in vitro* se ajusta a mayores humedades relativas y niveles de luz. Otros enfoques incluyen el enriquecimiento de CO₂ (Lakso y cols., 1986) o iluminación suplementaria (Desjardins y cols., 1987). Procedimientos más sofisticados de aclimatación *ex vitro* utilizan climatizadores controlados por ordenador (Maene y Debergh, 1985; Kozai y cols., 1987), que puede modular la humedad relativa, la temperatura, la intensidad de la luz, la concentración de CO₂, la velocidad del flujo del aire y hasta la temperatura de la solución nutritiva y tiene el potencial para controlar casi todas las otras características del medio ambiente. Se hace especial énfasis en minimizar el estrés hídrico en las primeras etapas *ex vitro*. No es sorprendente que en una unidad de este tipo se incremente significativamente tanto la supervivencia del trasplante como la tasa de crecimiento. Las plántulas aclimatadas por lo general se trasplantan a macetas de tamaño grande, bolsas de plástico u otros recipientes con tierra o mezclas adecuadas o directamente al campo para un mayor crecimiento. Hay que tener especial cuidado para regar suficientemente las plantas micropropagadas durante los primeros días.

c) Antitranspirantes.

La pulverización de plántulas para recubrirlas de materiales impermeables (glicerol acuoso al 50%, parafina de bajo punto de fusión o grasa de petróleo, disuelto en éter dietílico), retardantes de crecimiento (paclobutrazol) y antitranspirantes (ácido abscísico) se ha defendido como un método para reducir la pérdida de agua del material recién trasplantado. Sin embargo, los antitranspirantes no han demostrado ser útiles en la mejora de la supervivencia *ex vitro*, siendo la fitotoxicidad y la interferencia con la fotosíntesis las posibles razones (Sutter y Hutzell, 1984).

1.3 La Vid.

Según la Organización Mundial de la Vid y del Vino (OIV, 2013), el cultivo de la vid se extiende por los cinco continentes ocupando 7,5 millones de ha. A pesar de la pérdida de superficie de viñedo desde el año 2000 (62,5%) hasta 2012 (56 %), Europa cuenta con la mayor superficie a nivel mundial, seguida de Asia (22,7%), América (13%), África (5,2%) y Oceanía (2,7%).

Los países europeos con mayor superficie de viñedo son España, Italia y Francia. España posee un lugar destacado como país vitícola; es el primer país en cuanto a superficie, suponiendo aproximadamente el 14 % de todo el viñedo mundial (un 36 % de la viña existente en la Unión Europea) y el tercero en producción. Los rendimientos medios por hectárea han sido tradicionalmente de los más bajos del mundo y esto se debe a que la vid se encuentra en un importante porcentaje sobre terrenos marginales, a lo que hay que sumar la edad avanzada las viñas y que es un cultivo mayoritariamente en secano (O.I.V., 2013).

El sector vitivinícola supone aproximadamente el 5,8 % de la producción final agraria española. La mayoría de la superficie cultivada se destina a vinificación, aproximadamente 5.600.000 toneladas de uva que proporcionan en torno a 40 millones de hectolitros (34,8 de vino y 5,1 de mosto). El cultivo de mesa representa en torno al 9 % de su producción total (O.I.V., 213).

1.3.1. El cultivo *in vitro* en la vid.

El cultivo *in vitro*, en general y para vid en particular, ofrece una serie de posibilidades que no presenta el cultivo tradicional, entre otras, la obtención de material libre de virus, la rápida propagación del material vegetal (situación especialmente interesante en la multiplicación de nuevos genotipos), la conservación de forma económica y a largo plazo (en frío y oscuridad) de material vegetal seleccionado y mantenimiento del cultivo en condiciones estériles para la protección frente a patógenos.

Los últimos estudios apuntan a que el futuro de la vitivinicultura pasa por adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento asociadas a un aumento de la concentración de CO₂ atmosférico, de la temperatura y de la sequía, lo que puede provocar la aparición de nuevos patógenos y plagas. En este sentido, son varios los institutos del CSIC que han abierto líneas de investigación para dar respuesta a estos desafíos, mediante técnicas de cultivos *in vitro*, en invernaderos-cámara, con el objetivo de obtener variedades de vid más resistentes y mejoradas genéticamente y, en consecuencia, afrontar los retos del cambio climático y lograr una producción sostenible en el futuro.

1.4 Variedad Pedro Ximénez.

Su cultivo está muy extendido por toda España, particularmente en Andalucía y Extremadura. Las cepas son vigorosas, de porte erguido, con buena producción pero con fertilidad limitada al tener tendencia al corrimiento e inadecuado cuajado de desborre y maduración en épocas medias.

Esta variedad es la base de vinos dulces con mucho cuerpo y aromas, con capacidad alcohólica muy elevada y baja acidez. Aunque da lugar a vinos de mejor y peor calidad, tienen un alto contenido en azúcares, por lo que son más naturales. Su cultivo se realiza fundamentalmente en las zonas de Montilla-Moriles, Jerez, Málaga y Valencia.

Los portainjertos que principalmente se utilizan con este cultivar son:

- 110 de Richter (*Berlandieri* x *Rupestris-Martin* var. Reseguier nº2).
- 41 B de Millardet (*Chaselas* x *Berlandieri*).
- 161-49 de Couderc (*Riparia* x *Berlandieri*).
- 420 A (*Riparia* x *Berlandieri*).

Es una variedad con baja resistencia a clorosis férrica, *Plasmopara viticola*, oidio y mildiu. Sin embargo presenta gran tolerancia a la filoxera gallicola. La uva de esta variedad se pudre más que ninguna otra, lo que proviene principalmente de lo mucho que la pican las avispas y abejas, atraídas por su alto contenido en azúcar y a la apertura del racimo con las lluvias.

Respecto a la ampelografía según la O.I.V. el pámpano joven tiene la extremidad de forma abierta, ésta carece de pelos, como la planta en general, y de pigmentación antociánica. Presenta porte semierguido, tanto los entrenudos como los nudos tienen color verde con rayas rojas, siendo los zarcillos de longitud media. La hoja joven es de color amarillo, siendo la adulta de tamaño mediano, corta longitud, forma del limbo pentagonal de color verde claro sin pigmentación antociánica con una ondulación generalizada del limbo entre los nervios principales. El perfil del limbo es de bordes hacia el haz, la longitud de los dientes es mediana y la relación de ésta respecto a la anchura de la base es también mediana, el seno peciolar es poco abierto en forma de V, siendo los senos laterales superiores cerrados en forma de U. La longitud del pecíolo es corta lo que lo hace muy corto en relación al nervio central. Presenta de uno a dos racimos florales por pámpano, de tamaño mediano y compacidad media, teniendo un número muy elevado de bayas. La longitud del pedúnculo es corta y de lignificación media. La baya de forma elíptica corta presenta una sección transversal circular, con color de la epidermis verde-amarillento (*Figura 1*), valores medios de pruina, de grosor de la piel medio y pulpa no coloreada, dura y succulenta, siendo la longitud de pedicelo corto y difícil de separar. La longitud de las pepitas es media al igual que su peso y carecen de estrías transversales en la cara dorsal.



Figura 1. Racimo y hojas de la variedad Pedro Ximénez.

El peso de uva/cepa es bajo, pero la concentración de azúcar es alto en el mosto.

La época de brotación puede verse afectada por periodo de heladas, mermándose la producción de ese año. El envero se produce a finales de julio, y la maduración del fruto a mediados de septiembre.

1.5. Método de evaluación de los efectos del estrés ambiental. Valoración de tolerancia.

La tasa fotosintética o fotosíntesis neta se expresa como la cantidad de CO_2 por unidad de área foliar y de tiempo, y se puede definir como la cantidad neta de carbono que se incorpora al vegetal en un momento dado. El CO_2 atmosférico es insuficiente para alcanzar el máximo de fotosíntesis en la hoja. Además, la difusión del anhídrido carbónico hasta el interior de la hoja y desde aquí a los cloroplastos encuentra resistencias como la apertura de los estomas, por lo que la conductancia estomática (G_s) es de gran importancia. La luz y las bajas concentraciones de CO_2 intercelular estimulan la apertura estomática. La pérdida de agua por transpiración a través de los estomas es la consecuencia inevitable de la apertura estomática para permitir la entrada de CO_2 , de ahí que exista una estrecha correlación entre fotosíntesis y transpiración, ambas dependientes de la conductancia estomática. La planta debe regular la apertura de los estomas de tal modo que maximice la entrada de CO_2 a la vez que minimice la pérdida de agua. En consecuencia, conocer los valores de cada uno de los factores que interaccionan en este delicado equilibrio permite conocer el estado fisiológico de la planta y su capacidad de aclimatación *ex vitro*. Pocos resultados se han publicado sobre la actividad fotosintética en el proceso de aclimatación *in vitro-ex vitro* de la vid. Casi exclusivamente Fila y colaboradores, han estudiado en profundidad este proceso en plantas micropropagadas de la variedad de vid 41B (Fila y cols., 1998 y 2006). En estos trabajos estos autores concluyen que la caracterización de la actividad fotosintética en las plantas aclimatadas *ex vitro* desde *in vitro* podría ganar precisión estudiando algunas variables, generalmente no consideradas, como el proceso de

difusión del CO₂. Hasta ese momento, el objetivo de las investigaciones ha procurado la mejora de la relación eficiencia fotoquímica/eficiencia bioquímica. En consecuencia, el estudio del intercambio gaseoso podrían mejorar los protocolos de aclimatación.

Los pigmentos fotosintéticos presentes en los cloroplastos son los responsables de captar la energía de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que incide sobre la hoja. Las moléculas de clorofila se organizan en grupos funcionales que actúan como antenas captadoras. Además de las clorofilas a y b, los carotenoides, constituidos por carotenos y xantofilas, se hallan presentes en las hojas de las plantas superiores y en todos los organismos fotosintéticos. La energía captada por los carotenos es transferida a las moléculas de clorofila.

2. OBJETIVOS.

El presente proyecto de investigación pretende evaluar fisiológicamente el proceso de aclimatación a condiciones *ex vitro* de plantas propagadas mediante cultivo *in vitro* de ápices axilares y apicales de la variedad de vid Pedro Ximénez. Para ello se valorará la pérdida de agua de los tejidos, la evolución de los niveles de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b y carotenoides) y el intercambio gaseoso (fotosíntesis neta, conductancia estomática y niveles de CO₂ intercelular) en el proceso de aclimatación desde el tubo de ensayo a condiciones de invernadero de dichas plantas micropropagadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Material Vegetal.

Se usa la variedad comercial Pedro Ximénez. El material vegetal (*Figura 2*) procede del banco de germoplasma *in vitro* existente en los laboratorios del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC).

El medio de cultivo empleado ha sido el denominado VID (Troncoso y cols., 1990) con las concentraciones de reguladores de crecimiento, azúcar y vitaminas indicadas en la *Figura 6*. Las condiciones de la cámara de cultivo han sido 24 ± 1 °C de temperatura, $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y 16 horas de fotoperiodo.



Figura 2. Planta de variedad comercial Pedro Ximénez en cámara de cultivo.

3.2. Propagación *in vitro* del material.

Al objeto de obtener el material suficiente para las pruebas, se micropropagaron individuos de Pedro Ximénez, 35 tubos de ensayo, el 21 de Diciembre del 2015 (1º siembra), 15 tubos de ensayo el 20 de Enero del 2016 (2º siembra) y 22 tubos de ensayo el 15 de Febrero del 2016 (3º siembra).

Se tomaron explantos homogéneos (1 cm y 1 yema) de plantas existente en el banco de germoplasma *in vitro* del IRNAS (CSIC), los cuales fueron llevados bajo cabina de flujo laminar (TELSTAR AH-100) (*Figura 3*) a tubos de vidrio (150 x 25 mm) con 10 cc de medio VID, cerrados con tapón de polipropileno transparentes y autoclavados previamente a 120°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. Una vez efectuada la siembra de los explantos, los tubos se sellaron con parafilm (*Figura 4*). La incubación se realizó en cámara de cultivo en las condiciones anteriormente citadas (*Figura 5*).



Figura 3. Cabina de flujo laminar.

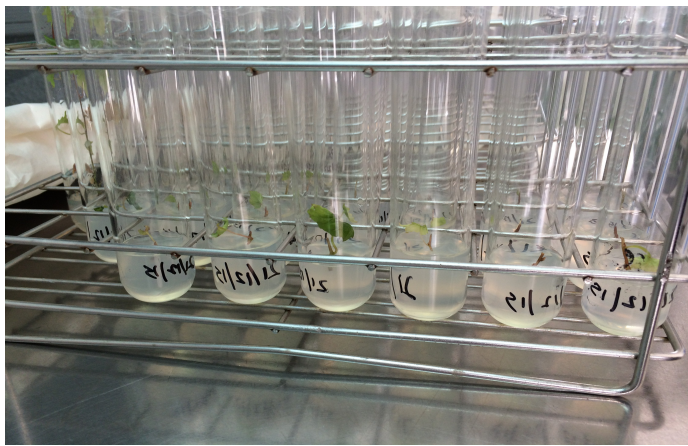


Figura 4. Siembra de explantos en tubo de ensayo.

De las plantas obtenidas *in vitro* se fueron realizando sucesivos subcultivos de explantos de 1 cm de longitud y con una yema, en el mismo medio de cultivo citado anteriormente, hasta alcanzar un número suficiente para establecer el ensayo.



Figura 5. Tubos en la cámara de cultivo.

La composición del medio de cultivo VD (medio vid) para un volumen de 1000 ml se indica (*Figura 6*) a continuación:

COMPOSITION OF THE VID CULTURE MEDIUM. (Troncoso et al., 1990)		
Macronutrients		mg/L
Potassium nitrate	KNO ₃	800
Calcium nitrate	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	300
Ammonium nitrate	NH ₄ NO ₃	800
Potassium dihydrogen ortho phosphate	KH ₂ PO ₄	170
Ferrous sulphate	FeSO ₄ 7H ₂ O	27,1
Magnesium sulphate	MgSO ₄ 7H ₂ O	370
Ferric sodium EDTA		37,3
Micronutrients		mg/L
Manganous sulphate	MnSO ₄ H ₂ O	0,85
Boric acid	H ₃ BO ₃	6,2
Zinc sulphate	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6
Sodium molybdate	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
Cupric sulphate	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
Cobalt chloride	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
Vitamints		mg/L
Tiamina		1
Mioinositol		100
Growth Regulators		mg/L
BAP		0,072
ANA		0,024
Agar: 0,6%	pH: 5,7	Sucrose: 3%

Figura 6. Composición del medio VID (Troncoso y cols., 1990).

3.2.1. Parámetros a evaluar.

a) **Supervivencia.**

Transcurridos 45 días de incubación in vitro en la cámara de cultivo se contabilizaron los explantos que habían desarrollado raíz y/o tallo; en el caso de desarrollo de ambos órganos se considera el término planta.

b) **Biometría.**

A los 15, 30 y 45 días en cámara de cultivo, de cada uno de los explantos, se realizaron las siguientes medidas: Longitud del tallo, número de yemas, número de ramificaciones, número de raíces y longitud de la raíz principal.

- Longitud tallo o parte aérea, expresado en centímetros (cm). Es la parte nueva que ha crecido a partir del explanto inicial.
- Número de yemas. Se tuvieron en cuenta el número de yemas nacidas sin contar la inicial.
- Número de ramificaciones. Para este parámetro se tomó como criterio que 5 yemas o más, constituyen una ramificación.
- Número de raíces. Se contaron todas las raíces desarrolladas por la planta.
- Longitud raíz. expresado en centímetros (cm), se midió la longitud de la raíz mayor de todas (raíz principal).

3.3. Aclimatación a condiciones externas.

Se usaron 63 plantas (de las que se utilizaron 12 para análisis de pigmentos y otras 20 se reservaron para conocer los pesos fresco y seco iniciales) procedentes de la micropropagación *in vitro*. Estas plantas se sometieron a un periodo de aclimatación al exterior. Para ello, los individuos obtenidos se trasplantaron a vasos de propileno de 330cc de capacidad, que contenían previamente turba de SPHAGNUM regada a saturación. La turba contenía además arcilla (10 g/l), carbonato cálcico (8 g/l), fertilizante NPK 14:10:18 (1,5 kg/m³) y microelementos (1,5 g/l). En primer lugar se extrajo la planta del tubo de cristal, eliminando todo posible resto de medio de las raíces. Una vez fuera, se introdujo la planta por su sistema radicular en el sustrato. Seguidamente el conjunto se cubrió con una bolsa de polipropileno transparente y pulverizada con agua para evitar el marchitamiento inmediato de la planta (*Figura 7*).



Figura 7. Conjunto de imágenes que muestran el proceso de trasplante.

Tras el trasplante, el conjunto de plantas depositadas en bandejas se llevaron a invernadero, con una temperatura controlada de entre 21 y 25 °C, una humedad relativa de entre 40 y 60 % y luz natural (flujo mínimo y máximo de luz: 200 y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente) (*Figura 8*). Después de 10 días en estas condiciones, se realizaron gradualmente cortes de los picos de la bolsa que recubría la maceta (*Figura 9*), con el fin de que la adaptación a las condiciones externas fuera progresiva y total (Cantos y cols., 1993).

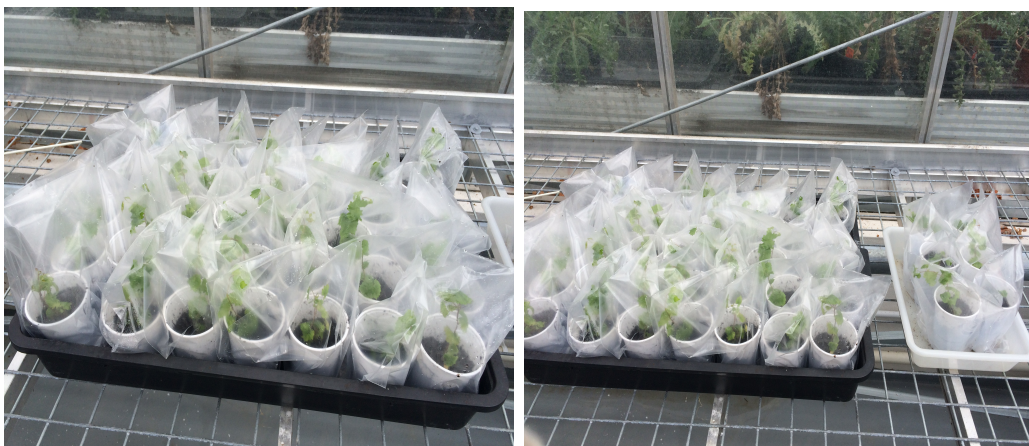


Figura 8. Plantas en el invernadero.

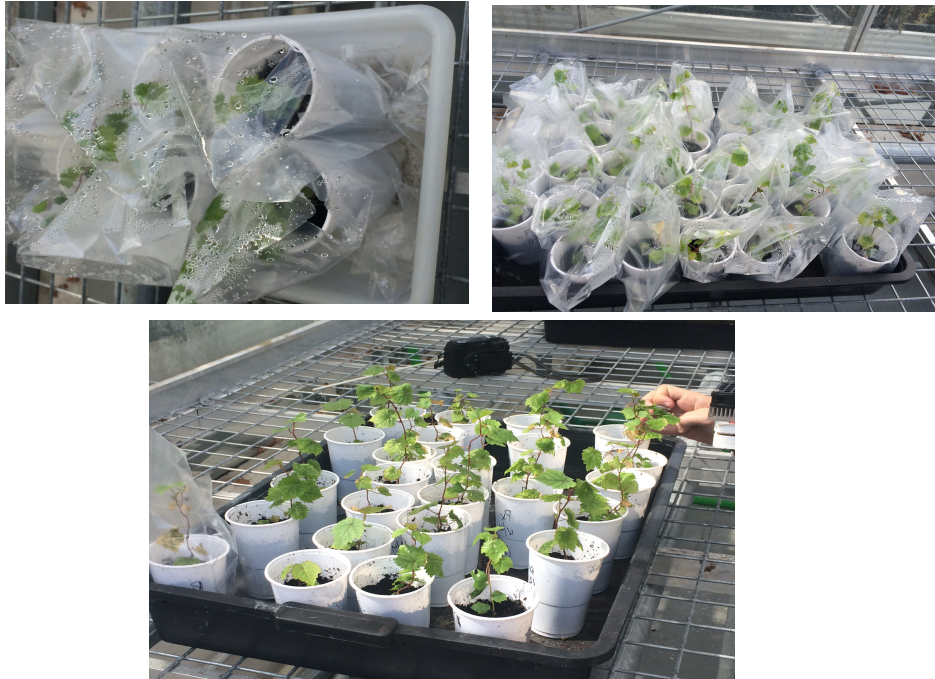


Figura 9. Corte de picos y retirada de bolsas.

3.4. Parámetros biométricos.

Las medidas de los diferentes parámetros se han llevado a cabo sobre grupos de cinco plantas destacadas directamente del tubo antes del trasplante (control 1); al cortar el primer pico tras 6 días en invernadero (control 2); al cortar el segundo pico de la bolsa transcurridos 3 días más (control 3) y tras quitarle completamente la bolsa, cuatro días más tarde (control 4).

Los parámetros considerados han sido:

a) Peso fresco.

Para la determinación del peso fresco de las plantas en cada uno de los controles, se pesaron por separado el tallo y la raíz, de cada una, en una balanza de precisión Mettler PJ 400 (precisión 0,01 g).

b) Peso seco.

Una vez determinado el peso fresco, los tallos y raíces de cada planta, se introdujeron en sobres convenientemente identificados, que se llevaron a estufa, donde permanecieron, durante 72 horas a 60 °C. Transcurrido este tiempo se les determinó el peso seco utilizando una balanza de precisión Cobos CB Complet (precisión 0,001 g).

c) Contenido hídrico.

El contenido hídrico o porcentaje de hidratación de la planta se obtuvo mediante la ecuación:

$$\text{Contenido hídrico (\%)} = [(pf-ps)/pf] \cdot 100$$

Donde:

pf= peso fresco.

ps= peso seco.

d) Tasa relativa de crecimiento.

La tasa relativa de crecimiento TRC (Villar y cols., 2004) de la parte aérea de las plantas se calculó mediante la fórmula:

$$\text{TRC (g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}) = (\ln Bf - \ln Bi) \cdot D^{-1}$$

Donde:

Bf= biomasa final seca.

Bi= biomasa inicial seca (media de los explantos de cada tratamiento secados en las mismas condiciones al inicio del experimento).

D= duración del experimento en días.

3.5. Parámetros bioquímicos.

a) Pigmentos.

En cada uno de los controles citados se tomaron tres plantas a las que se les determinó por separado el contenido de pigmentos fotosintéticos. Las concentraciones de clorofila a (Clf a), clorofila b (Clf b) y carotenoides (carotenos y xantofilas; Cx+c) se obtuvieron aplicando la formulación de Lichtenthaler (1987). Para ello, se tomaron 50 mg de hojas frescas de cada planta, de las 12 plantas introducidas en nitrógeno líquido. Al conjunto se le añadieron 10 mL de acetona al 80 % y se procedió a su triturado con arena. La mezcla resultante se tamizó a través de un papel de filtro para retener los restos de membranas de las hojas. Al filtrado se le midió la absorbancia (A) a tres longitudes de onda (470,0, 646,8 y 663,2 nm) utilizando para ello un espectrofotómetro Hitachi U-2001 (Japón). Se realizó una medida de la absorbancia en cada uno de los grupos.

3.6. Intercambio gaseoso.

Las mediciones de intercambio gaseoso (tasa de fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (G_s) y contenido de CO_2 intercelular (C_i)) fueron realizadas en el momento de eliminar la bolsa completamente (control 4) en hojas totalmente expandidas en 10 plantas tomadas al azar, (Figura 10), utilizando un analizador de gases infrarrojo (IRGA) (Figura 11) en circuito abierto (LI-6400, LI-COR Inc., Nebraska, EE.UU.). La tasa de fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la concentración intercelular de CO_2 se determinaron a una concentración de CO_2 ambiente de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ a $20\text{-}25^\circ \text{C}$, $50 \pm 5\%$ de humedad relativa y a las siguientes densidades de flujo de fotones: $200, 600$ y $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La iluminación se obtuvo de una lámpara de luz fotosintéticamente activa acoplada a la cámara de hojas del LI-6400. La temperatura de las hojas se mantuvo entre 20 y 25°C , y la humedad relativa entre el 45 y 55% . Los valores de los parámetros A , C_i y G_s se calcularon utilizando la fórmula estándar de Von Caemmerer y Farquhar (1981).

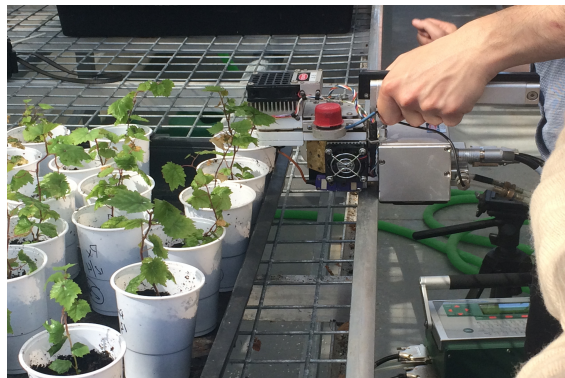


Figura 10. Toma de datos intercambio gaseoso.



Figura 11. Analizador de gases infrarrojo (IRGA)

3.7. Tratamientos estadísticos.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto se han tratado mediante el paquete estadístico informático IBM SPSS Statistics V.22. Con el mismo se calcularon estimadores de centralización, dispersión y la comparación entre medias a través del cálculo ANOVA mediante test de Tuckey. La comparación entre porcentajes se efectuó mediante la prueba z (t de Student) del mismo paquete informático utilizando la corrección de Bonferroni. El grado de relación entre las diferentes variables consideradas se determinó, en su caso, mediante el coeficiente de correlación r. Para ello se utilizaron las tablas de significación de Lamotte, (1976).

4. RESULTADOS

4.1 Micropropagación de los individuos.

En la *tabla 1*, se indica la evolución de los valores resultantes de la micropropagación, en cada una de las tres siembras, de explantos de la variedad Pedro Ximénez durante los primeros 45 días de cultivo, momento en el que se consideró que las plantas estaban suficientemente desarrolladas para acometer con éxito la fase de aclimatación.

Tabla 1. Evolución y comportamiento de los explantos de PX cultivados in vitro sobre medio VID.

		Número de siembra	15 días	30 días	45 días
Supervivencia (%)		1º siembra	11,43 A	68,57 A	82,86 A
		2º siembra	0,00 A	53,33 A	80,00 A
		3º siembra	40,91 B	86,36 A	86,36 A
TALLO	Longitud del tallo (cm)	1º siembra	0,05 AB	0,27 A	1,58 A
		2º siembra	0,00 A	0,42 A	1,82 AB
		3º siembra	0,31 B	1,11 B	3,11 B
	Número medio de yemas	1º siembra	0,17 AB	1,37 AB	2,97 A
		2º siembra	0,00 A	1,23 A	3,85 A
		3º siembra	0,36 B	2,40 B	6,20 A
	Número medio de ramificaciones laterales	1º siembra	0,00 A	0,04 A	0,20 AB
		2º siembra	0,00 A	0,00 A	0,69 B
		3º siembra	0,00 A	0,00 A	0,00 A
SISTEMA RADICULAR	Número medio de explantos enraizados (%)	1º siembra	0,00 A	65,71 A	74,29 A
		2º siembra	0,00 A	40,00 A	66,67 A
		3º siembra	22,73 B	77,27 A	81,82 A
	Número medio de raíces	1º siembra	0,00 A	3,91 A	4,77 A
		2º siembra	0,00 A	4,00 A	6,60 A
		3º siembra	1,40 B	3,76 A	4,56 A
	Longitud media de raíces (cm)	1º siembra	0,00 A	2,19 A	6,00 A
		2º siembra	0,00 A	2,57 AB	9,18 AB
		3º siembra	0,62 B	4,00 B	11,1 B

Letras diferentes para cada siembra leídas en columna en una misma fecha de control indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada parámetro considerado (Test t Student; $p \leq 0,05$).

El primer parámetro de la tabla 1 indica la evolución del porcentaje de explantos supervivientes, es decir, que desarrollan tallo y/o raíz, a los 15, 30 y 45 días desde el inicio de la micropropagación. Tal y como queda reflejado en la tabla, transcurridos los primeros quince días, ningún explanto de la segunda siembra muestra crecimiento ni de la parte aérea ni radicular. Por el contrario, en la primera siembra se alcanza un 11.43% de explantos con algún desarrollo, mientras que en los explantos de la tercera siembra el porcentaje de supervivencia es el más alto ($p \leq 0,05$) con un 40,91 %. A partir de los 30 primeros días, el porcentaje de explantos que crecen en la primera y segunda siembra va aumentando y, en consecuencia, se reducen las diferencias entre los porcentajes de explantos desarrollados de las tres siembras. Al final del periodo de propagación *in vitro* los porcentajes de supervivencia respectivos para la primera, segunda y tercera siembras ascienden a 82,86, 80,00 y 86,36 %, similares entre sí.

En los controles quincenales efectuados se aprecian diferencias entre las longitudes medias de los tallos de las tres siembras. Desde la primera medida se observa un mayor desarrollo de los explantos de la tercera siembra, que en este primer control alcanza una media de 0,31 cm, claramente superior ($p \leq 0,05$) al obtenido en la segunda siembra, donde no hay ningún desarrollo, y similar a los 0.05 cm de la primera siembra. Este desarrollo mayor de la tercera siembra se mantiene en los sucesivos controles mostrando a los 30 días un valor medio de 1.17 cm muy superior ($p \leq 0,05$) a los registrados en las dos primeras siembras. Transcurridos el mes y medio, las plantas de la tercera siembra (*Figura 14*) llegan a 3.11 cm. superando a las plantas de la primera siembra ($p \leq 0,05$) (*Figura 13*), con 1.58 cm, y a las de la segunda (*Figura 12*), 1.82 cm, aunque en este caso sin diferencias estadísticas entre ambas.



Figura 12. Segunda siembra de la variedad Pedro Ximénez.



Figura 13. Primera siembra de la variedad Pedro Ximénez.



Figura 14. Tercera siembra de la variedad Pedro Ximénez.

Respecto al número medio de yemas por planta, en la primera medida, 15 días, ya se vuelven a observar diferencias para este parámetro en los explantos de las tres siembras, ya que los de la tercera siembra muestran una media de 0.36, mientras que los de la segunda no desarrollan ninguna nueva yema (*Tabla 1*). Conforme transcurre el tiempo, la diferencia va haciéndose cada vez mayor a favor de las plantas de la tercera siembra que, tras 45 días de cultivo *in vitro*, llegan a mostrar de media 4.20 yemas por planta. Las de la segunda siembra superan con 3.85 cm, a las de la primera (2.97 cm). No obstante, no se encuentran diferencias estadísticas entre ambos valores.

En relación a la capacidad de emitir ramificaciones laterales por parte de los explantos de Pedro Ximénez, en la tabla 1 se observa que en la tercera siembra no se desarrolla ninguna ramificación lateral durante los 45 días de crecimiento de los explantos.

A los 30 únicamente en los explantos de la primera siembra se encuentran ramificaciones laterales y con un valor medio muy bajo, 0.04. Transcurridos 45 días los sembrados en la segunda siembra son los que desarrollan un número relativamente bajo de ramificaciones laterales, 0.69, aunque suficiente para ser estadísticamente superior ($p \leq 0.05$) al valor medio de 0.20 alcanzado por los explantos de la primera siembra.

Los explantos de la tercera siembra son los más precoces en emitir raíces ya que son los únicos en enraizar a los 15 días con un 22,73% de explantos con raíz, por lo que ya podrían denominarse plantas. Transcurrido un mes se destacan los de la tercera y primera siembra con porcentajes superiores al 65%. Esta tendencia para estas siembras se mantiene a los 45 días, superando el 74% de plantas enraizadas, quedando las plantas de la segunda siembra en el 66.7%.

El número medio de raíces por planta a los 15 días de la siembra es elevado ($p \leq 0.05$) en las plantas de la tercera siembra, 1.40. Como se puede observar en la tabla, a los 30 y 45 días, el número medio de raíces es muy similar en las plantas de las tres siembras alcanzando valores superiores a los 4.5 raíces por planta, sin diferencias entre ellos.

La tabla 1 indica también las longitudes medias de raíces (cm) por planta de cada una de las siembras, tras los 45 días de duración del periodo de desarrollo *in vitro*. Las raíces de la tercera siembra, únicas que se desarrollan a los 15 días, alcanzan 0.62 cm de longitud media. Estas diferencias se mantienen durante los 45 días ($p \leq 0.05$) respecto a las plantas de la siembra primera, ya que las plantas de esta tercera siembra alcanzan los 11.1 cm de longitud media de raíz. Un valor muy próximo, al final del periodo de crecimiento, se registra en las plantas de la segunda siembra, 9.18, y ya menor ($p \leq 0.05$), 6.0, en las de la primera.

4.2. Adaptación a condiciones externas.

4.2.1 Respuesta de los individuos tras 45 días de cultivo *in vitro*.

Para homogeneizar los datos, en el caso de la TRC se toma como peso seco inicial el del explanto en el momento de su establecimiento *in vitro*.

En la tabla 2 se comparan los diferentes parámetros relacionados con los pesos fresco y seco del material vegetal en las diferentes fases de aclimatación consideradas después de 45 días de desarrollo *in vitro*.

Tabla 2. Comparación pesos fresco y seco, porcentajes de hidratación y tasa relativa de crecimiento (TRC) en cada una de las fases de adaptación consideradas tras 45 días de cultivo *in vitro*.

Fase de adaptación	Días desde inicio de adaptación	Pf,T (g)	Ps,T (g)	HT (%)	TRC (g/g ⁻¹ /día)
Directamente de tubo	0	0.43 a	0.19 b	58.1 a	0.079 b
Corte 1 ^{er} pico	8	0.51 a	0.07 a	86.31 c	0.059 a
Corte 2 ^o pico	11	0.61 a	0.12 ab	79.69 bc	0.072 ab
Eliminación de la bolsa	15	0.38 a	0.09 ab	75.28 b	0.065 ab
7 días después de la eliminación de la bolsa	22	0.59 a	0.16 ab	74.88 b	0.077 b

Letras distintas leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas (Test t Student; $p \leq 0,05$) para cada uno de los parámetros considerados en las diferentes fases de aclimatación

Se observa en dicha tabla que el peso fresco del tallo en cada una de las fases de adaptación oscila entre los 0.38 y 0.61 gramos, sin diferencias estadísticas entre ellos. Los pesos secos del tallo están comprendidos entre los 0.07 gramos de las plantas en el momento de cortarle el primer pico a la bolsa y los 0.19 cuando salen directamente del tubo, diferentes ($p \leq 0,05$) entre sí. El resto de pesos secos se encuentran comprendidos entre ambos valores. En lo que se refiere a la humedad relativa de las plantas en cada una de las fases de adaptación, la más elevada se encuentra en las que se eliminó el primer pico de la bolsa, 86.31%, seguida de las plantas a las que se les cortó el segundo pico de la bolsa, 79.69%, que son similares estadísticamente. Las plantas con menor porcentaje de humedad y, por consiguiente, las que pierden más agua, son las que no tuvieron ninguna protección tras ser extraídas del tubo de ensayo, que conservan solamente un 58.1% de humedad. La tasa relativa de crecimiento (TRC) también varía dependiendo de la fase que se considere, así las que más crecen ($p \leq 0,05$) son las que se sacan inmediatamente del tubo y las que llevan 7 días sin protección con 0.079 y 0.077 gramos por gramo diario respectivamente, respecto a las obtenidas tras cortar el primer pico, 0.059, aunque similares estadísticamente a la TRC de las plantas de las macetas a las que se les cortó el segundo pico de la bolsa, 0.072 y a las medidas inmediatamente después de la retirada de la bolsa.

4.3. Evolución de la pérdida del contenido de agua.

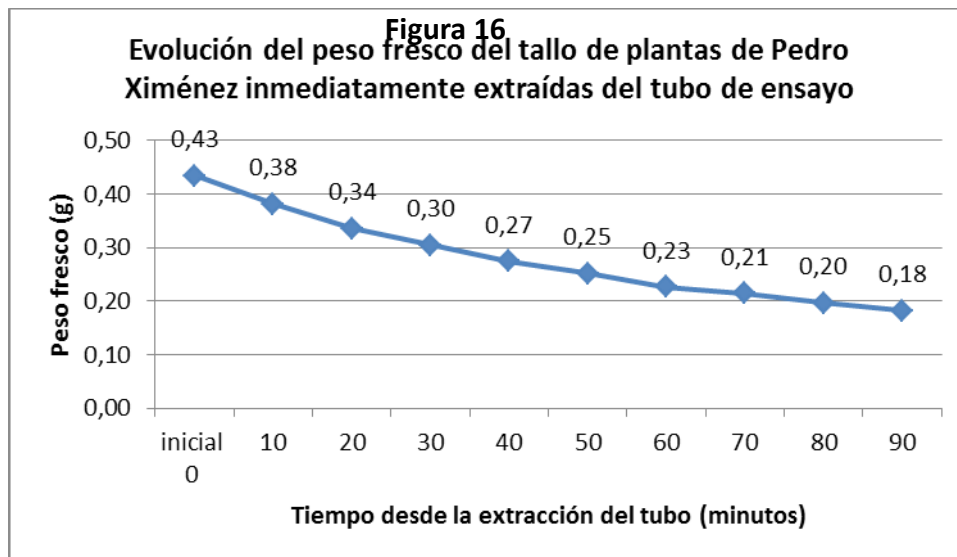
En este apartado se estudia la evolución cada 10 minutos, hasta alcanzar los 90, de la pérdida media de agua. Esta media se obtiene de la pesada de cada una de cinco plantas elegidas al azar, inmediatamente después del primer y segundo corte de pico de la bolsa, inmediatamente después de la retirada de la bolsa y tras 7 días en el invernadero carentes de bolsa.

En un control inicial donde se contabiliza los pesos frescos de raíz y tallo por separado de dos plantas tras sacarlas del tubo de ensayo, se observa que transcurridos 10 y 20 minutos, las pérdidas de agua de la raíz son mínimas (*Figura 15*), pérdidas de peso fresco de 0.004 y 0.02 gramos respectivamente, por lo que se asume que la raíz no incide de manera relevante en la pérdida de agua en la aclimatación de las plantas al exterior y el ensayo se lleva a cabo controlando las variaciones de peso fresco solamente en la parte aérea.



Figura 15. Cuantificación de la pérdida de peso, contenido de agua, en la planta fuera del tubo de ensayo.

En la figura 16 se observa la evolución del peso fresco del tallo de las plantas durante los 90 minutos inmediatamente después de extraídas del tubo de ensayo después de 45 días de cultivo *in vitro*.

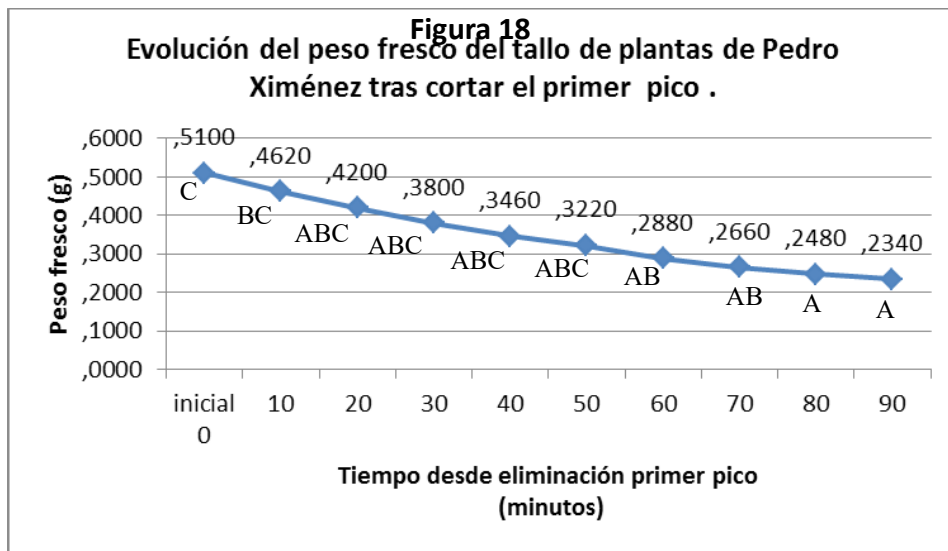


En esta gráfica se observa una pérdida de peso fresco continuada desde la extracción de la planta del tubo, 0.43 gramos, hasta los 0.18 que se registran transcurridos 90 minutos, sin diferencias estadísticas entre ninguno de los pesos parciales incluidos el inicial y final a pesar de perderse 0.25 gramos entre ambos tiempos (*Figura 17*), lo que significa un 58.14%.



Figura 17. Comparación del estado de turgencia de la planta tras 90 minutos sin protección.

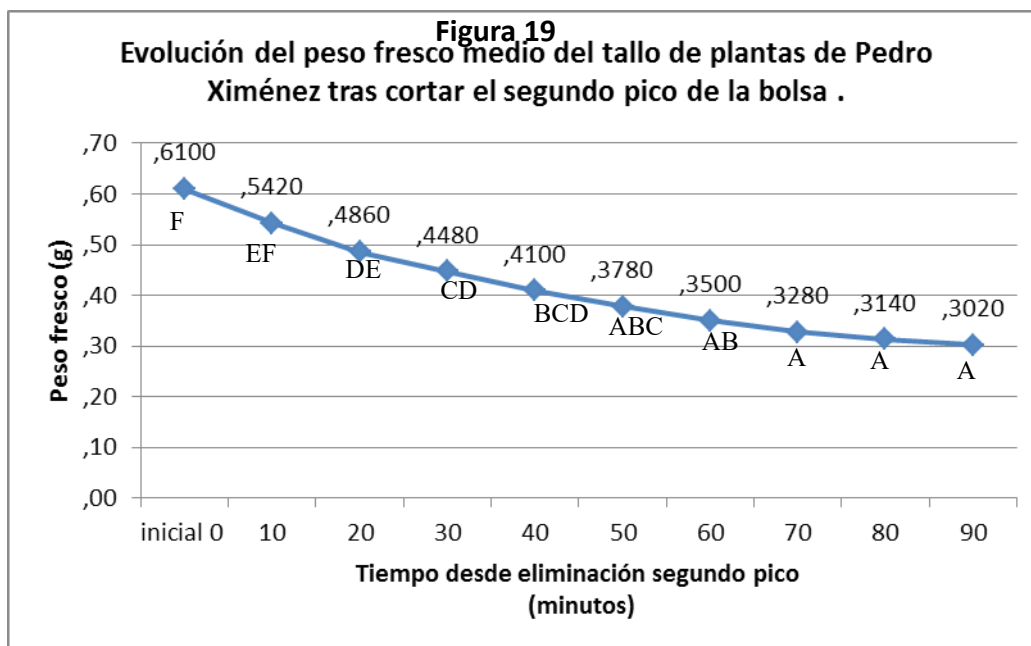
En la figura 18 se observa la evolución del peso fresco del tallo de las plantas durante los 90 minutos inmediatamente después de eliminarle un pico a la bolsa con la que se protegieron las planta tras el trasplante después de 45 días de cultivo *in vitro*.



Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Test t Student; $p \leq 0,05$) para cada uno de los controles parciales (cada 10 minutos) considerados.

En este caso, como se observa en la figura 18, sí hay diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre los pesos secos parciales. Tras eliminar el primer pico de la bolsa el peso fresco medio es 0.51 gramos, similar estadísticamente a los registrados hasta los 50 minutos. A partir de los 60 minutos el peso fresco contabilizado es de aproximadamente 0.29 gramos ya diferente ($p \leq 0,05$) al inicial. También resultan estadísticamente inferiores los pesos frescos medidos a los 80 y 90 minutos respecto al inicial y al registrado a los 10 minutos. Se cuantifica una pérdida de peso fresco a los 90 minutos de 0.276 gramos respecto al inicial lo que representa una pérdida de agua del 54.12%.

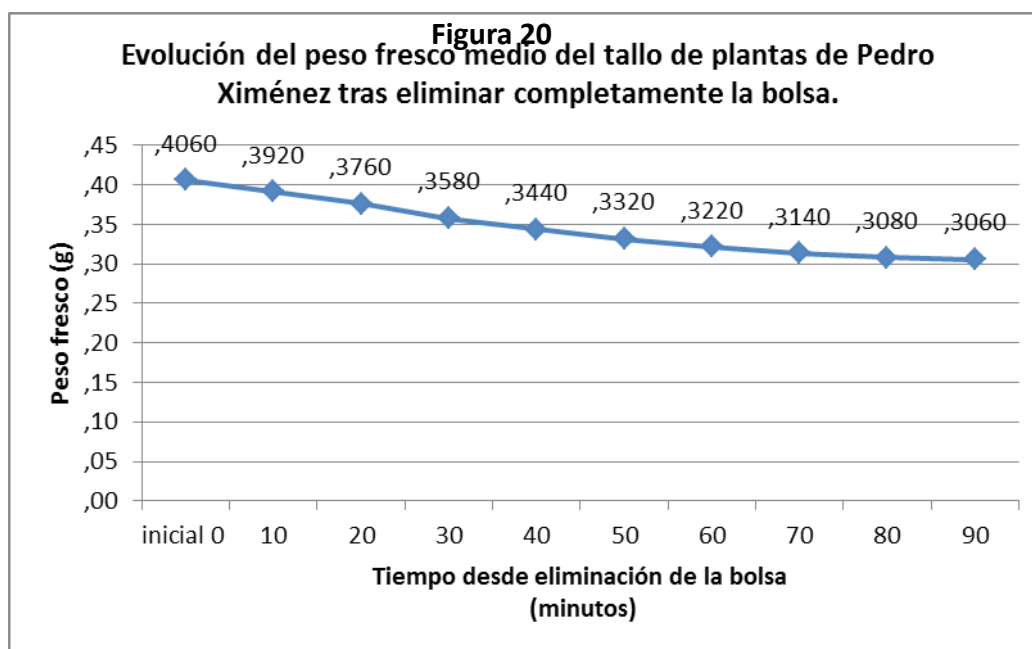
En la figura 19 se indica la evolución del peso fresco del tallo de las plantas inmediatamente después de eliminarle el segundo pico a la bolsa.



Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Test t Student; $p \leq 0,05$) para cada uno de los controles parciales (cada 10 minutos) considerados.

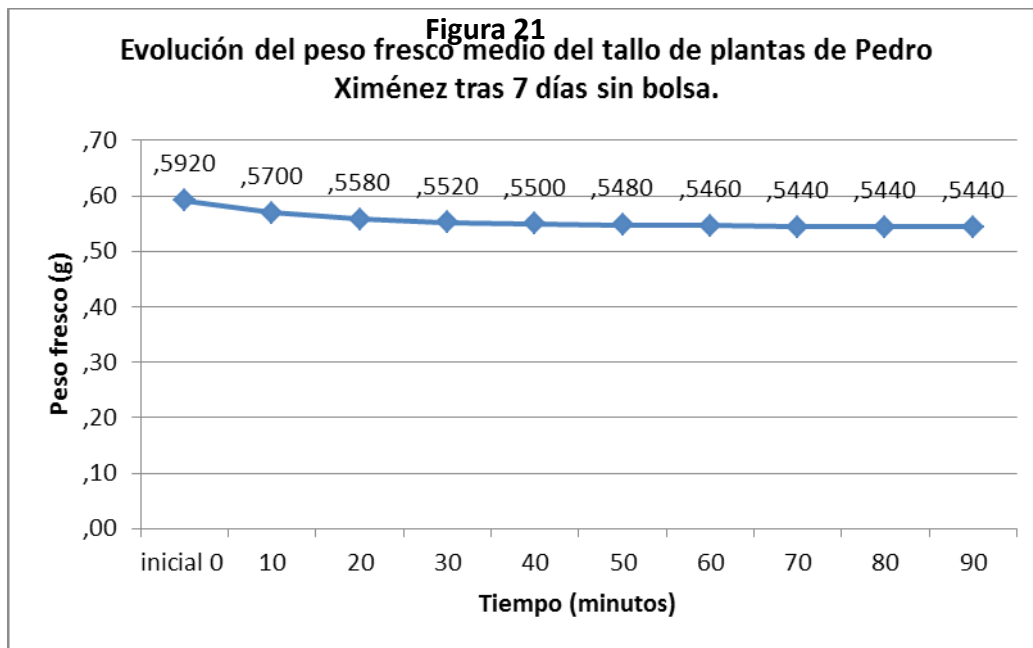
Al igual que ocurriera tras el corte del primer pico, cuando se elimina el segundo se observa una diferencia importante en los pesos frescos de los controles parciales efectuados cada 10 minutos. En este caso, como se observa en la figura 16, el peso medio de las cinco plantas tomadas inicialmente, tiempo cero, es de 0.61 gramos, superior estadísticamente al registrado a los 20 minutos, que a su vez es significativamente mayor al cuantificado a los 50 minutos. Al final del periodo de mediciones el peso se reduce a 0.302 gramos, lo que significa un 50.5% de pérdida de agua.

En la figura 20 se representa la evolución del peso fresco del tallo de las plantas de Pedro Ximénez inmediatamente después de eliminar completamente la bolsa.



En este caso, aunque se repite el descenso continuado del peso fresco, las diferencias entre los diferentes muestreos son mucho menores lo que se traduce en una ausencia de diferencias estadísticas entre los registros parciales. La diferencia entre los pesos inicial y final es de 0.1 gramos, lo que representa una pérdida de agua del 24.6%.

Para finalizar con la última fase considerada en el proceso de aclimatación desde *in vitro* a *ex vitro*, en la figura 21 se indica la evolución de los pesos frescos medios de las plantas transcurrida una semana desde la desaparición de la bolsa.



Según se observa en la figura, la pendiente es mucho más suave que en las fases anteriores con diferencias mínimas entre el peso fresco inicial, 0.59, y final, 0.54 gramos, también sin diferencias estadísticas entre los diferentes controles intermedios. En consecuencia, la pérdida de peso es de sólo 0.05 gramos y, por consiguiente, la pérdida de agua es de sólo 8.5%.

4.4. Pigmentos fotosintéticos.

En la tabla 3 se indican los contenidos de clorofila a, b y carotenoides (carotenos + xantofilas) en cada una de las fases de aclimatación consideradas.

Tabla 3.- Comparación de los niveles medios de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{gg-1}$) en las hojas de Pedro Ximénez cultivadas in vitro sobre medio VID, en las diferentes fases de aclimatación.

Situación y días desde el trasplante entre paréntesis	Cla $\mu\text{gg-1}$	Clb $\mu\text{gg-1}$	c+x $\mu\text{gg-1}$
Trasplante directamente de tubo (0)	2.06 b	0.64 b	0.54 b
Corte 1 ^{er} pico (8)	1.44 ab	0.43 ab	0.47 ab
Corte 2 ^o pico (11)	0.91 a	0.28 a	0.29 a
Eliminación de la bolsa (15)	1.08 a	0.29 a	0.37 ab
7 días después de la eliminación de la bolsa (22)	1.05 a	0.23 a	0.37 ab

Letras distintas leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas (Test t Student; $p \leq 0,05$) para cada uno de los parámetros considerados en las diferentes fases de aclimatación

Se observa en la tabla un descenso en la concentración de pigmentos. Los contenidos medios de clorofilas a y b son significativamente menores ($p \leq 0,05$) tras cortar el segundo pico de la bolsa. En el caso de los carotenoides, aunque también se observa una tendencia descendente, solamente hay diferencias significativas entre los contenidos medidos en el momento del trasplante y tras realizar el segundo corte de la bolsa.

4.5. Intercambio gaseoso.

Tras medir la tasa de fotosíntesis neta, la tasa de conductancia estomática y la concentración de CO_2 intercelular de las plantas consideradas, tanto inmediatamente después de eliminar completamente la bolsa, como a los 3 y 5 días tras dicha eliminación a tres intensidades lumínicas diferentes, se observa una ausencia total de función fotosintética por parte de la plantas en todas las medidas efectuadas. En las tablas 4 y 5 se indican respectivamente los valores medios de conductancia estomática y concentración de CO_2 intercelular medidas simultáneamente con la tasa de fotosíntesis neta.

Tabla 4.- Evolución de los valores medios de conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en las hojas de Pedro Ximénez en la fase de adaptación desde in vitro a condiciones externas medidos a diferentes intensidades luminosas.

Intensidad lumínica ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0 días	3 días	5 días
200	-0.48 a A	-0.11 b B	-0.17 b A
600	-0.70 a A	-0.15 b A	-0.14 b B
1000	-0.78 a A	-0.16 b A	-0.15 b B

Letras minúsculas distintas leídas en fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre días. Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre intensidades lumínicas.

En la tabla 4 se observa que en todos los casos la tasa de conductancia estomática presenta valores negativos. En todas las intensidades lumínicas ensayadas se observa un aumento de la conductancia estomática ($p \leq 0,05$) a los tres días de eliminada la bolsa. No obstante, este aumento no se mantiene a los cinco días presentando valores similares a los registrados tras 3 días sin bolsa. El efecto de la intensidad lumínica no es claro ya que, aunque la tasa de conductancia estomática muestra una tendencia a disminuir a medida que se incrementa la intensidad lumínica inmediatamente después de eliminar la bolsa, en ningún caso el descenso es significativo estadísticamente. Por otro lado, transcurridos tres días desde la eliminación de la bolsa, la conductancia estomática es mayor ($p \leq 0,05$) con 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que con 600 y 1000, pero posteriormente, cuando han transcurrido 5 días la tendencia se invierte y la tasa de conductancia estomática es mayor con 600 y 1000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 5.- Evolución de los valores medios del contenido de CO₂ intercelular ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) en las hojas de Pedro Ximénez en la fase de adaptación desde in vitro a condiciones externas medidos a diferentes intensidades luminosas.

CO₂ intercelular ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	0 días	3 días	5 días
200	666.4 b A	406.6 ab A	386.6 a A
600	679.6 b A	400.0 a A	381.6 a A
1000	726.0 b A	396.8 a A	387.4 a A

Letras minúsculas distintas leídas en fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre días. Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre intensidades lumínicas.

En la tabla 5 se advierte la ausencia de efecto de la intensidad luminosa sobre la concentración de CO₂ intercelular en los tejidos de las hojas en todo el periodo muestreado posterior a la desaparición de la bolsa. Sí se observa en dicha tabla que a medida que las plantas se van adaptado tras eliminar la bolsa el CO₂ intercelular va disminuyendo, sobre todo en los primeros 3 días de adaptación, ya que no se encuentran diferencias en este parámetro transcurridos dos días más sin protección.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudia, por primera vez para plantas de la variedad de vid Pedro Ximénez, el impacto que sobre la fisiología de la planta tiene el proceso de adaptación desde condiciones *in vitro* al exterior.

A pesar de usarse un tamaño similar de explanto, el mismo medio de cultivo y las mismas condiciones de crecimiento en la cámara de cultivo *in vitro*, se observa una precocidad diferente de los explantos de Pedro Ximénez en la respuesta a la diferenciación y desarrollo de nuevo tejido en función de la fecha en las que se han propagado. Esta diferencia debe ser atribuida a la edad del material de partida conservado en el banco de germoplasma *in vitro* y que ha sido repicado para la obtención del nuevo material para su aclimatación posterior. Así, las plantas de Pedro Ximénez utilizadas para extraer los explantos de la primera siembra llevaban conservadas 228 días en condiciones *in vitro*, mientras que para las usadas en la segunda siembra el tiempo de permanencia fue de 350 días. En el caso de las elegidas para propagar en la tercera siembra el periodo de conservación *in vitro* previo a su propagación fue de 110 días. Es decir, el material vegetal más juvenil responde más precozmente a su desarrollo. Este efecto queda corroborado por los coeficientes de correlación entre los porcentajes medios de explantos que diferencian nueva parte aérea o radicular, lo que se viene denominando en el presente trabajo "supervivencia", y los tiempos de estancia en la cámara de cultivo del material previos a su propagación, $r = -0.9665$ y -0.9985 , para los 15 y 30 días tras la propagación respectivamente. Esta influencia de la edad del material está corroborado por varios autores para diferentes tipos de planta (Ozel et al., 2015; Cardoso y Habermann, 2014) incluido el cultivo de embriones somáticos de vid (Roichev y cols., 2007). No obstante, en el control efectuado a los 45 días se observa una homogeneización del desarrollo de los explantos independientemente de la edad de la planta madre de partida. En consecuencia, se obtiene un material vegetal uniforme y de buena calidad para su trasplante a suelo, incluso con parámetros biométricos superiores a los obtenidos por Maghradze y cols. (2015) para la misma variedad de vid en condiciones muy similares de micropropagación. Esta calidad indicada explica que en el presente estudio el 100% de las plantas se hayan adaptado al exterior tras 22 días desde el trasplante a suelo.

Una vez comprobado que la raíz no sufre pérdidas significativas de agua respecto a la parte aérea tras la extracción de la planta del tubo de ensayo, se consideran solamente el tallo y las hojas de las plantas como responsables principales de la adaptación al exterior tras 45 días de cultivo *in vitro*. Esta decisión viene, asimismo, fundamentada en la amplia bibliografía descrita en el apartado de introducción del presente trabajo, que describe la trascendencia de la morfología y función de la hoja en la aclimatación de las plantas procedentes del recipiente de cultivo.

El periodo de 22 días posteriores al trasplante a suelo considerado en este trabajo abarca la fase inmediata y, por consiguiente la más delicada, respecto a la aclimatación de la planta. Durante este periodo el sistema de gestión del agua por parte de la planta deberá regularse fisiológicamente para acometer la gradual pérdida de humedad a la que se verá

sometida para sobrevivir y desarrollarse convenientemente en el nuevo ambiente. Durante el periodo citado se observa que los pesos fresco y seco y la TCR no se incrementan, es decir la planta no crece durante la aclimatación.

Las plantas mantenidas fuera del tubo de ensayo durante 90 minutos muestran una pérdida de peso fresco de 0.25 gramos, es decir pierden un 58.14% de agua. Este porcentaje es muy similar al registrado por ese mismo material tras 72 horas en estufa a 70°C, 58.10%, metodología rutinaria en el cálculo del peso seco en tejidos vegetales. Esta similitud indica que en los 90 primeros minutos la planta pierde, por falta de adaptación funcional de su sistema de transpiración, prácticamente todo su contenido de agua y, en consecuencia, es inviable su supervivencia. La ausencia de diferencias estadísticas entre los pesos parciales efectuados en cada uno de los periodos intermedios de 10 minutos se puede explicar por la variabilidad interna de los grupos de cinco plantas al ser tomadas al azar. Tras el corte del primer pico de la bolsa del grupo de plantas protegidas durante 8 días, mediante su trasplante a maceta con alta humedad relativa tanto en el sustrato como en la parte aérea, se registra una disminución del peso fresco de 0.27 gramos, es decir, la pérdida de agua también es elevada, 54.12%, aunque menor a la de la situación anterior. Es decir, ya se empieza a detectar un inicio de regulación de la pérdida de agua por parte de la planta. En esta, que podríamos llamar segunda fase de aclimatación, sí existen diferencias estadísticas entre los pesos frescos parciales, lo que confirma la progresiva pérdida de agua a lo largo del tiempo. Cuando se corta el segundo pico a la cubierta de plástico transcurridos 11 días desde el trasplante, se observa que el porcentaje de pérdida de agua tras los 90 días se reduce sensiblemente frente a las fases anteriores, 29.2%, mostrando también diferencias estadísticas entre los controles parciales cada 10 minutos. Cuando pasan 15 días desde el trasplante, se elimina totalmente la bolsa y las plantas pierden en el periodo de tiempo citado, un peso medio de 0.1 gr, lo que significa una pérdida de hidratación del 24.6%. Este porcentaje disminuye aún más, hasta el 8.5%, en la última fase de la aclimatación considerada, es decir, siete días después de eliminar completamente la bolsa. En estos dos últimos controles no se encuentran diferencias significativas en los pesos parciales debido a la suavidad de la pérdida de agua que hace muy similares los pesos frescos registrados en cada periodo de 10 minutos considerados. Es decir, la pérdida de agua entre cada intervalo de tiempo cada vez es menor, con lo cual la planta se está estabilizando, es decir, se considera aclimatada en el sentido de no correr riesgo de muerte.

Por otro lado, en lo que respecta a la evolución de pigmentos fotosintéticos se observa una pérdida progresiva de éstos a medida que avanza la adaptación de la planta.



Figura 22. Planta tras 22 días desde el trasplante a suelo. Se aprecia el deterioro de las hojas procedentes de *in vitro*.

Esta pérdida es más acusada a partir de que la planta se cubre con la cubierta de plástico. Este hecho viene acompañado por la total ausencia de función fotosintética en ninguna de las tres intensidades lumínicas empleadas durante los cinco días siguientes a la eliminación de la bolsa, por lo que la planta sólo respira, tratando de sobrevivir a las nuevas condiciones ambientales, no invirtiendo energía en el proceso fotosintético, que además se ve dificultado por el descenso en la concentración de pigmentos fotosintéticos. No obstante, aunque la planta parece no realizar fotosíntesis durante los cinco primeros días tras la eliminación de la bolsa, sí se observa a los tres y cinco días un aumento significativo en la tasa de conductancia estomática y una disminución de la concentración de CO_2 intercelular respecto al momento de la eliminación de la bolsa. Esto podría indicar que en el citado periodo la planta experimentó ciertos cambios, que en un momento dado le llevarían a alcanzar un estado fisiológico tal que permitiese el normal desarrollo de la función fotosintética. Por otro lado el envejecimiento y pérdida de pigmentos de las hojas persistentes procedentes de *in vitro* (Figura 22) apunta a que éstas pudieran ser una fuente de nutrientes para el desarrollo de nuevas hojas fotosintéticamente activas que permitirán a la planta su total adaptación al exterior.

En los trabajos de Fila y cols., fundamentalmente en el publicado en 2003 con plantas del portainjerto 41B, único encontrado en la bibliografía similar al presente trabajo, el estudio sobre el comportamiento de la planta procedente de *in vitro* comienza a los dos meses de la eliminación de la protección, en consecuencia, no se recoge la respuesta de la planta al proceso seguido durante la eliminación de la bolsa que la cubre.

Como resumen final se puede destacar la obtención, mediante micropropagación, de plantas de Pedro Ximénez bien desarrolladas, que tras 22 días de adaptación a condiciones externas se aclimataron en su totalidad. Los cambios observados durante las diferentes etapas de la adaptación en las que se ha ido disminuyendo paulatinamente la humedad relativa se centran en una regulación efectiva de la pérdida de agua y un posible uso de los nutrientes de las hojas persistentes, procedentes del cultivo *in vitro*, para procurar, en una primera etapa, la supervivencia y posteriormente diferenciar hojas fotosintéticamente activas que desarrollen una actividad fisiológica normalizada en la planta final.

6. CONCLUSIONES

1. Las condiciones de micropropagación a partir de yemas apicales y axilares de la variedad de vid Pedro Ximénez empleadas en el presente trabajo permiten obtener plantas óptimamente desarrolladas, que tras 22 días se adaptan en su totalidad a condiciones externas.
2. La duración del periodo de conservación *in vitro* de la planta madre incide significativamente en la precocidad en la respuesta *in vitro* de los explantos obtenidos.
3. Durante el periodo de adaptación considerado, 22 días, las plantas no crecen y su inversión energética parece dedicarse principalmente a la regulación de la pérdida de agua.
4. Durante el periodo de aclimatación no se detectan tasas de fotosíntesis neta positivas, y las plantas únicamente respiran.
5. Se detecta una ligera disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos durante las diferentes fases de la aclimatación.
6. Se observa un deterioro de las hojas persistentes desarrolladas en el recipiente de cultivo *in vitro*, cuyos nutrientes pudieran ser utilizados para el desarrollo de nuevas hojas fotosintéticamente activas.
7. El presente trabajo aborda por primera vez el estudio de aspectos fisiológicos de la adaptación al exterior de plantas de Pedro Ximénez inmediatamente después de trasplantadas desde las condiciones *in vitro*. Los resultados obtenidos pueden ayudar a reducir los daños sufridos por la planta durante dicho proceso de aclimatación.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- **Afreen-Zobayed, F.; Zobayed, S.M.A.; Kubota, C.; Kozai, T.; and Hasegawa, O.** (1999). Supporting material affects the growth and development of in vitro sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 35:470–474.
- **Azofeifa, A.** (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1):153-175.
- **Barlass, M.; and Skene, K.G.M.** (1978). In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis*, 17:335–340.
- **Basail, M.; Medero, V.; Cabrera, M.; Santos, A.; Torres, M.; Ortega, A.; López, J.; Rayas, A.; Beovides, Y.; Paz, E.** (2008). Multiplicación de *Ipomoea batatas* clon “INIVITB2-2005” en sistemas de inmersión temporal. *Rev. Biotecnología Vegetal*, 8(2):103-106.
- **Bates, S.; Prece, J.E.; Navarrete, N.E.; Van Sambeek, J.W.; and Gaffney, G.R.** (1992). Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 31:21–29.
- **Bazan, A.** (2009). Propagación de ondas en sistemas con geometrías complejas. *Universidad Politécnica de Madrid*.
- **Benavides, A.** (2002). *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo, COAH. México.
- **Biddington, N.L.** (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulat.* 11:173–187.
- **Blokhina, O.; Virolainen, E.; and Fagerstedt, K.V.** (2003). Antioxidant, oxidative damage, and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot. (Lond.)*, 91:179–194.
- **Bowes, G.** (1991). Growth at elevated CO₂: Photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant Cell Environ.*, 14:795–806.
- **Cantos, M.; Liñán, J.; Ostas, P.; Paneque, P.; Pérez, F.; y Troncoso, A.** (2005). “Contenidos de nutrientes en hoja de cultivar de vid “Pedro Ximénez” en la Denominación de Origen Montilla-Moriles (DOMM)”. En: *V Congreso Ibérico de Ciências Hortícolas: [comunicações]*. Vol.3, p. 257-262.

- **Cañal, M.J.; Rodríguez, R.; Fernández, B.; Sánchez, R.; y Majada, J.P.** (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 1, 3-9.
- **Cardoso, J.C.; Habermann, G.** (2014). Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andreanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. *Horticulture, Environment and Biotechnology*. Vol. 55(1), 56-62.
- **Carmi, F.; Barriza, E.; Gardiman, M.; and Schiavo, F.** (2005). Somatic embryogenesis from stigmas and styles of grapevine. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41:249–252.
- **Cerda, A.; Morales, A.; Rallo, P.; Jiménez, M.; Cassanova, L.; et al.** (2007). *Propagación Vegetal: Prácticas*. Universidad de Sevilla: Universidad de Sevilla.
- **Chee, R.; and Pool, R.M.** (1989). Morphogenic responses to propagule trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114:350–354.
- **D’Onofrio, C.; and S. Morini.** (2005). Development of adventitious shoots from in vitro grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration. *Biol. Plant*, 49:17–21.
- **Dai, Y.J.; Shen, Z.G.; Liu, Y.; Wang, L.L.; Hannaway, D.; and Lu, H.F.** (2009). Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. *Environ. Expt. Bot.*, 65:177–182.
- **Dhekney, S.A.; Li, Z.T.; Zimmerman, T.W.; and Gray, D.J.** (2009). Factors influencing genetic transformation and plant regeneration of *Vitis*. *Amer. J. Enol. Viticult.*, 60:285–292.
- **Dhekney, S.A.; Li, Z.T.; Compton, M.E.; and Gray, D.J.** (2009). Optimizing Initiation and Maintenance of *Vitis* Embryogenic Cultures. *HortScience*, 44(5):1400-1406.
- **Faust, J.E.; Holcombe, V.; Rajapakse, N.C.; and Layne, D.R.** (2005). The effect of daily light integral on bedding plant growth and flowering. *HortScience*, 40:645–649.
- **Finer, L.; Ohashi, M.; Noguchi, K.; and Hirano, Y.** (2011). Fine root production and turnover in forest ecosystems in relation to stand and environmental characteristics. *For. Ecol. Mgt.*, 262:2008–2023.
- **Fourie, P.H.; and Halleen, F.** (2004). Proactive control of petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Dis.*, 88:1241–1245.

- **Fourie, P.H.; and Halleen, F.** (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.*, 116:255–265.
- **Frid, D.** (2009). *Reproducción de plantas in vitro y sus beneficios para la agricultura* [en línea]. [Consulta: 2 marzo 2016]. Disponible en: <http://tecnocienciaysalud.com/plantas-in-vitro>
- **Gamborg, O.L.; Phillips, G.C.** (1995). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer Lab Manuals.
- **García, J.L.** (1999). *Características morfo-anatómicas, fisiológicas y bioquímicas de plantas jóvenes de olivo (Olea europea L.) obtenidas in vitro, en función de la fuente y concentración de nitrógeno*. Universidad de Sevilla.
- **Gordon, I.** (2009). Propagation-From stem cuttings. *Hort. J.*, 2:18–22.
- **Gouk, S.S.; Yong, J.W.H.; and Hew, C.S.** (1997). Effects of super-elevated CO₂ on the growth and carboxylating enzymes in an epiphytic CAM orchid plantlet. *J. Plant Physiol.*, 151: 129–136.
- **Gray, D.J.; and Benton, C.M.** (1991). In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivar (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 27:7–14.
- **Gray, D.J.; Jayasankar, S.; and Li, Z.** (2005). *Vitis* spp. grape, p. 672–706. In: Litz, R.E. (ed.). *Biotechnology of fruit and nut crops*, CAB International Wallingford, Oxford, UK.
- **Gribble, K.** (1999). The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. *Plant Growth Regulat.* 27:181–190.
- **Han, S.; Jiang, J.; Li, H.; Song, A.; Chen, S.; and Chen, F.** (2015). The Differential Response of Two Chrysanthemum Cultivars to Shading: Photosynthesis, Chloroplast, and Sieve Element-companion Cell Ultrastructure. *HortScience*, 50(8):1192-1195.
- **Harris, R.E.; and Stevenson, J.H.** (1982). In vitro propagation of *Vitis*. *Vitis*, 21:22–32.
- **Hawkins, S.M.; Ruter, J.M.; Robacker, C.D.** (2015). Spray and Drench Treatments of Paclobutrazol Influence Growth of *Dioscorea* and *Tibouchina*. *HortScience*, 50(10), 1514-1517.

- **Hazarika, B.** (2003). Acclimatization of tissue- cultured plants. *Current Science*, 85(12):1704- 1712.
- **Hazarika, B.** (2006). Morpho-physiological disorders in vitro culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108:105-120.
- **Heloir, M.C.; Fournioux, J.C.; Oziol, L.; and Bessis, R.** (1997). An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 49:223– 225.
- **Hernández, J.** *Fluorescencia de clorofilas* [en línea]. Grupo de biotecnología de frutales (CEBAS-CSIC). [Consulta: 15 febrero 2016]. Disponible en: <https://antioxidantsgroup.wordpress.com/2013/10/10/fluorescencia-de-clorofilas/>
- **Hubbs A.; y Roy H.** (1992). Synthesis and assembly of large subunits into Ribulose Biphosphate Carboxylase Oxygenase in chloroplast extracts. *Plant Physiol*, 100:272-281.
- **Ibáñez, A.; Valero, M.; and Morte, A.** (2003). Influence of cytokinins and subculturing on proliferation capacity of single-axillary-bud microcuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Napoleón. *Ann. Biol.*, 25:81–90.
- **Jeannin G.; Brunner R.; y Hahne G.** (1995). Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: role of the sugar. *Plant Cell Rep*, 15:200-204.
- **Kahia, J.; Sallah, P.K.; Diby, L.; Kouame, C.; Kirika, M.; Niyitegeka, S.; Assimwe, T.** (2015). A Novel Regeneration System for Tamarillo (*Cyphomandra betacea*) via Organogenesis from Hypocotyl, Leaf, and Root Explants. *HortScience*, 50(9):1375-1378.
- **Kaity, A.; Parisi, A.M.; Ashmore, S.E.; Drew, R.A.** (2009). Root initiation and acclimatization of papaya plants. *Acta Hort ISHS*, 812:387–394.
- **Khan, H.; Siddique, I.; and Anis, M.** (2006). Thidiazuron action inhibitor silver nitrate induced somatic embryogenesis and plant. *Acta Physiol Plant*, 26(3):299–305.
- **Kim, M.J.; Ciani, S.; and Schachtman, D.P.** (2010). A peroxidase contributes to ROS production during Arabidopsis root response to potassium deficiency. *Mol. Plant*, 3:420–427.
- **Kim, S.; Hahn, E.; Heo, J.; and Paek, K.** (2004). Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. *Sci. Hort.*, 101:143–151.

- **Kubota, C.; Kakizaki, N.; Kozai, T.; Kasahara, K.; and Nemoto, J.** (2001). Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. *HortScience*, 36:49–52.
- **Lee, N.; and Wetzstein, H.Y.** (1990). In vitro propagation of Muscadine grape by Axillary shoot proliferation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115:324– 329.
- **Lewandowski, V.T.** (1991). Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* ‘Delaware’. *HortScience*, 26:586–589.
- **Li, S.W.; Xue, L.; Xu, S.; Feng, H.; and An, L.** (2009). Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Bot. Rev.*, 75:230–247.
- **Loescher W.H.; Tyson R.H.; Everard J.D.; Redgwell R.J.; y Bialeski R.L.** (1992). Mannitol synthesis in higher plants. Evidence for the role and characterization of a NADPH dependent mannosyl 6-phosphate reductase. *Plant Physiol.*, 98:1396-1402.
- **Lopez, M.** *Vinos Pedro Ximénez*. Los vinos de Montilla Moriles. [Consulta: 26 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.pedroximenez.es/>
- **Lopez, R.G.** (2007). Stock plant and propagation photosynthetic daily light integral and storage influences postharvest performance of herbaceous cuttings. PhD Diss., Dept. of Horticulture, Michigan State Univ., East Lansing, MI.
- **Lopez, R.G.; and Runkle, E.S.** (2008). Photosynthetic daily light integral during propagation influences rooting and growth of cuttings and subsequent development of New Guinea impatiens and petunia. *HortScience*, 43:2052–2059.
- **Maghradze, D.; Ocete, R.; García, J.L.; Cantos, M.** (2015). Micropropagation and in vitro germplasm conservation of Georgian wild grapevines. *Vitis*, 54: 257–258.
- **Maity, S.; Ray, S.; and Banerjee, N.** (2005). The role of plant growth regulators on direct and indirect plant regeneration from various organs of *Leucaena leucocephala*. *Acta Physiol. Plant.*, 27:473–480.
- **Martínez, R.; Azpiroz, H.; Rodríguez, J.L.; Cetina, V.M.; Gutiérrez, M.A.; Saduño, R.R.; et al.** (2010). *Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales*. Libros técnicos: serie forestal. Universidad Autónoma Indígena de México.
- **Mhatre, M.; Salunkhe, C.K.; and Rao, P.S.** (2000). Micropropagation of *Vitis vinifera* L: Towards an improved protocol. *Sci. Hort.*, 84:357–363.
- **Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7:405–410.

- **Morales, A.; Rallo, P.; Cassanova, L.; Arenas, F.; y Pérez, L.** (2008). *Propagación vegetal*. Universidad de Sevilla: Universidad de Sevilla.
- **Moreira da Silva, M.H.; and Debergh, P.C.** (1997). The effect of light quality on the morphogenesis of in vitro culture of *Azorina vidalii*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 51, 187–193.
- **Mukherjee, P.; Husain, N.; Misra, S.C.; and Rao, V.S.** (2010). In vitro propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators. *Sci. Hort.*, 126:13–19.
- **Nguyen, Q.V.; Sun, H.J.; Boo, K.; Lee, H.; Lee, J.H.; Lim, P.O.; Lee, H.Y.; Riu, K.Z.; and Lee, D.S.** (2013). Effect of plant growth regulator combination and culture period on in vitro regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Biotechnol. Rep.*, 7:99–108.
- **Norikane, A.; Takamura, T.; Morokuma, M.; and Tanaka, M.** (2010). In vitro growth and singleleaf photosynthetic response of *Cymbidium* plantlets to super-elevated CO₂ under cold cathode fluorescent lamps. *Plant Cell Rpt.*, 29:273–283.
- **Novak, F.J.; and Juvova, Z.** (1983). Clonal propagation of grapevine through in vitro axillary bud culture. *Sci. Hort.*, 18:231–240.
- **Olate, E.; Escobar, L.H.; Sepulveda, C.; Rios, C.; and Errandonea, P.** (2010). Advances and strategies for micropropagation of Proteaceae species. *Acta Hort.*, 869:157–164.
- **Ozel, C.A.; Khawar, K.M.; Unal, F.** (2015). Factors affecting efficient in vitro micropropagation of *Muscari muscarimi* Medikus using twin bulb scale. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol. 22(2):132-138.
- **Osta, P.; Paneque, G.; Paneque, P.; Pérez, F.; y Troncoso, A.** (2005). “Geopedological and climatic zoning of the “Pedro Ximenez” vineyard of the “Montilla-Moriles” registered appellation of origin Mark (RAOM) (Córdoba-Spain). Relationship with the plant nutritive status and fruit and must production and quality”. *En: XIV International GESCO Viticulture Congress*. Geisenheim. Germany, p. 275-280.
- **Ozel, C.A.; Khawar, K.M.; Mirici, S.; Arslan, O.; and Ozcan, S.** (2006). Induction of ex vitro adventitious roots on softwood cuttings of *Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey using indole 3-butyric acid and a-naphthalene acetic acid. *Intl. J. Agr. Biol.*, 8:66–69.
- **Parris, J.K.; Touchell, D.H.; Ranney, T.G.; and Adelberg, J.** (2012). Basal Salt Composition, Cytokinins, and Phenolic Binding Agents Influence In Vitro Growth and Ex Vitro Establishment of *Magnolia* “Ann”. *HortScience*, 47(11):1625-1629.

- **Pence, V.C.** (2010). The possibilities and challenges of in vitro methods for plant conservation. *Kew Bull.*, 65:539–547.
- **Perrin, M.; Gertz, C.; and Masson, J.E.** (2004). High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19 grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Sci.*, 167:1343–1349.
- **Pierik, R.L.M.** (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa.
- **Pinto, A.C.R.; Graziano, T.T.; Barbosa, J.C.; and Lasmar, F.B.** (2006). Growth retardants on production of flowering potted Thai tulip. *Bragantia*, 65:369–380.
- **Pospíšilová, J.; Ticha, I.; Kadlecek, P.; Haisel, D.; and Plzakova, S.** (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biol. Plant.*, 42:481–497.
- **Preece, J.; and West, T.** (2006). Greenhouse growth and acclimatization of encapsulated *Hibiscus moscheutos* nodal segments. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 87:127–138.
- **Quartacci, M.F.; Cosi, E.; and Navarri-Izzo, F.** (2001). Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J. Expt. Bot.*, 354:77–84.
- **Rademacher, W.** (2000). Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 51:501–531.
- **Read, P.E.** (2007). Micropropagation: Past, present and future. *Acta Hort.*, 748:17–27.
- **Roichev, V.; Yancheva, S.D.; Petkova, S.** (2007). Embryogenesis in seedless grapes and hybrid combinations of (*Vitis vinifera* L.) - Somatic embryogenesis in liquid culture. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, Vol. 21(1): 43-48.
- **Rolland, F.; Baema-González, E.; and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:675–709.
- **Sansberro, P.A.; Rey, H.Y.; Bernardis, A.; Luna, C.; Collavino, M.; and Mroginski, L.A.** (2000). Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by in vitro culture of nodal segments. *Biocell*, 24:53–63.

- **Santos, C.; Brito, G.; Pinto, G.; y Fonseca, H.** (2003). In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*. *Scientia Horticulturae*, 97:83-87.
- **Sen, A.; y Alikamanoglu, S.** (2013). Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde and total phenolic content of PEG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 49:396-404.
- **Serek, M.; Prabucki, A.; Sisler, E.C.; and Andersen, A.S.** (1998). Inhibitors of ethylene action affect final quality and rooting of cuttings before and after storage. *HortScience*, 33:153–155.
- **Shan, F.; and Seaton, K.** (2007). Micropropagation of the grape imported from overseas while under quarantine using tissue culture and IVS system—Benefits WA viticulture industry. *Wine Industry Newsletter*, 85(6).
- **Shan, F.; Seaton, K.** (2014). Semi-sterilized Tissue Culture for Rapid Propagation of Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Using Immature Cuttings. *HortScience*, 49(7):949-954.
- **Singh, N.P.; Malhi, C.S.; and Dhillon, W.S.** (2004). Effect of plant bioregulators on the promotion of flowering in mango cv. Dusehri. *J. Res. Punjab Agr. Univ.*, 3:341–344.
- **Singh, S.J.; Khawale, R.N.; and Singh, S.P.** (2004). Technique for rapid in vitro multiplication of *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 79:267–272.
- **Smeekens, S.** (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51:49–81.
- **Smith, M.** (2008). *Manual de reproducción vegetal*. Omega.
- **Sparks, D.** (2005). Adaptability of pecan as a species. *HortScience*, 40:1175–1189.
- **Sun, Y.; Zhang, D.; and Smagula, J.** (2010). Micropropagation of *Ilex glabra* (L.) A. Gray. *HortScience*, 45:805–808.
- **Thies, K.; and Graves, C.H.** (1992). Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. *HortScience*, 27:447– 449.
- **Torres, A.P.; and López, R.G.** (2011). Photosynthetic Daily Light Integral during Propagation of *Tecoma stans* Influences Seedling Rooting and Growth. *HortScience*, 46(2):282-286.
- **Tsuda, H.; Kunitake, H.; Aoki, Y.; Oyama, A.; Tetsumara, T.; Komatsu, H.; and Yoshioka, K.** (2014). Efficient In Vitro Screening for Higher Soil pH Adaptability of

Intersectional Hybrids in Blueberry. *HortScience*, 49(2):141-144.

- **Van Huylenbroeck, J.; Piqueras, A.; y Debergh, P.** (2000). The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated Calathea plants. *Plant Science*, 155:59-66.
- **Villalobos, V.M.; y Thorpe, T.A.** (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Cap. 6 Editado por Roca, W. y Mrojinski, L. CIAT, Bogotá, Colombia.
- **Villegas A.; Mazuelos C.; Cantos M.; y Troncoso A.** (1992). Influencia del nitrógeno sobre el desarrollo in vitro del portainjerto de vid 161-49. *Suelo y Planta*, 2:529-539.
- **Viveros, B.** *Pedro Ximenez. Productiva y resistencia a sequía* [en línea]. VitiViniCultura. [Consulta: 26 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.vitivinicultura.net/pedro-ximenez.html>
- **Wadl, P.A.; Dattilo, A.J.; Vito, L.M.; and Trigiano, R.N.** (2011). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Pityopsis ruthii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 106:513–516.
- **Waldhoff, D.; Furch, B.; and Junk, W.J.** (2002). Fluorescence parameters, chlorophyll concentration and anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in Central Amazonia *Symmeria paniculata*. *Environ. Expt. Bot.*, 48:225–235.
- **Walker, M.A.; and Golino, D.A.** (1999). Rapid propagation of grape planting stock. *Practical Vinery & Vineyard Journal*. May/June: 29–38.
- **Whipker, B.E.** (2013). Plant growth regulator guide. *GrowerTalks*, p. 1–37.
- **Wu, H.C.; and Lin, C.C.** (2013). Carbon Dioxide and Enrichment during Photoautotrophic Micropropagation of *Protea cynaroides* L. Plantlets Improves In Vitro Growth, Net Photosynthetic Rate, and Acclimatization. *HortScience*, 48(10):1293-1297.
- **Xiao, Y.; and Kozai, T.** (2004). Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: Plantlet growth and production cost. *Hort. Sci.*, 39:1387–1391.
- **Xiao, Y.; and Kozai, T.** (2006). In vitro multiplication of static plantlets using sugar-free media. *Sci. Hort.*, 109:71–77.
- **Yao, Y.; Min, Y.; Geng, M.; Wu, X.; Hu, X.; Fu, S.; y Guo, J.** (2013). The effects of calcium of the in vitro Cassava storage root formation. *Advanced Materials*

Research, 726-731:4529-4533.

- **Zaffari, G.R.; Kerbauy, G.B.; Kraus, J.E.; and Romano, E.C.** (2000). Hormonal and histological studies related to in vitro banana bud formation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 63(3):187–192.
- **Zhang, M.P.; Zhang, C.J.; Yu, G.H.; Jiang, Y.Z.; Strasser, R.J.; and Yuan, Z.Y.** (2010). Changes in chloroplast ultrastructure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a superhigh-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. *J. Plant Physiol.*, 167:277–285.
- **Zhang, R.; Peng, F.; Yan, P.; Cao, F.; and Liu, Z.** (2015). Effects of Roots Pruning on Germinated Pecan Seedlings. *HortScience*, 50(10):1549-1552.