

Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento vegetativo de plantas *in vitro* de caña de azúcar, en fase de aclimatación (*Saccharum spp.*)

Emma Pineda-Ruiz*, Aydiloide Bernal-Villegas, Rafael Gómez-Kosky, Rafael Más-Martínez, Reinaldo Mora-Varona, Ada Teresa Aguiar-Fernández, Delvis Viera-Ávalos, Mirelys Alejo-Sierra, y Yordanis Benítez-Trujillo.

Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Villa Clara. Autopista Nacional, km 246. Ranchuelo, Villa Clara.

*emmapineda1958@gmail.com

RESUMEN

La eficiencia del proceso de aclimatación *ex vitro* de plantas de caña de azúcar, depende de varios factores, como elección del sustrato y obtención de una relación adecuada entre los componentes de la mezcla, que asegure buena supervivencia, que permita la formación de un cepellón con una buena estructura. El sustrato, en esta fase, es determinante para alcanzar plantas de calidad que garanticen un adecuado crecimiento, bajo condiciones ambientales controladas. El objetivo de este trabajo es evaluar cuatro sustratos para determinar la posibilidad de ampliar su uso como sustratos alternativos y apreciar su efecto en el crecimiento vegetativo de plantas *in vitro*, en fase de aclimatación en el cultivar C1051-73. Se realizó la caracterización de la composición química de los sustratos y se evaluó el crecimiento de las plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro*, hasta los 60 días. Se realizaron las siguientes evaluaciones: supervivencia, altura, diámetro, hojas totales, activas e inactivas, largo y ancho de la hoja +1 y longitud de la raíz, plantas existentes, dañadas y formación del cepellón. El residuo sólido del biogás formado a partir de vinaza, presentó un contenido superior de materia orgánica y macroelementos totales, lo que permitió el crecimiento de plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro* y su uso como sustrato alternativo.

Palabras clave: plantas *in vitro*, aclimatación, sustrato, compost, vinaza.

ABSTRACT

The efficiency of the *ex vitro* acclimatization process of sugarcane plants depends on several factors, such as the choice of the substrate and obtaining an adequate relationship between the components of the mixture, which ensures good survival, which allows the formation of a root ball with a good structure. The substrate, in this phase, is decisive to achieve quality shoots that guarantee adequate growth, under controlled environmental conditions. The objective of this work was to evaluate four substrates to determine the possibility of expanding their use as alternative substrates, assessing their effect on the vegetative growth of *in vitro* plant in the acclimatization phase in sugarcane cultivar C1051-73. The characterization of the chemical composition of the substrates was carried out and the *in vitro* plants growth was evaluated under *ex vitro* conditions up to 60 days. The following evaluations were made: survival, height, diameter, total leaves, active and inactive, leaf length and width +1 and root length, existing and damaged plants and root ball formation. The solid residue of the biogas formed from vinasse, presented a higher content of organic matter and total macroelements, which allowed the *in vitro* plants growth under *ex vitro* conditions and its use as an alternative substrate.

Key words: *in vitro* plants, acclimatization, substrate, compost, vinasse.

INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* es una metodología muy empleada en la caña de azúcar a nivel mundial, desde que comenzaron las investigaciones relacionadas con este tema en Hawaii, en 1960, según Wekesa *et al.* (1). En Cuba se comenzó a aplicar a gran escala en los laboratorios comerciales (Biofábrica), en la década de los 80, destacan Aragón *et al.* (2).

La propagación vía organógenesis en esta especie vegetal consta de cinco fases, destacan Santana *et al.* (3): fase 0 ó preparativa, establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización. La última etapa es la más importante del proceso, según plantean Chandra *et al.* (4). Ya que, fundamentalmente, en su continuo crecimiento y desarrollo, se requiere de un proceso de adaptación a factores bióticos y abióticos, analizan Chacón *et al.* (5). También las pérdidas pueden estar entre el 50 a 90 %, indica Cedeño y Macías (6).

El manejo de las plantas *in vitro*, en condiciones *ex vitro*, resulta determinante para lograr la obtención de más de un 90 % de supervivencia. Para ello, la elección del material a considerar, en esta etapa, es importante para evitar la pérdida de material vegetal según Cetré *et al.* (7). El éxito del proceso de propagación *in vitro* radica en lograr la aclimatación de las plantas *in vitro*, en condiciones ambientales *ex vitro*, aseveran Jo-García *et al.* (8).

Según García *et al.* (9), la eficiencia del proceso de aclimatación de las plantas de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) *in vitro*, en condiciones *ex vitro* depende, también, de varios factores, entre ellos, la elección del sustrato y la obtención de una relación adecuada entre los componentes de la mezcla, que asegure buena supervivencia. El sustrato deberá permitir la formación de un cepellón con una de buena estructura, indicó Cortegaza (10).

Para la elaboración de sustratos se utilizan materiales de disponibilidad local, tales como compost, obtenido de los restos de caña de azúcar (cachaza), de la industria, aseguran Díaz *et al.* (11), la zeolita y el residuo sólido de biogás, consideran Pineda *et al.* (12), entre otros. El objetivo de este trabajo es evaluar cuatro sustratos para determinar la posibilidad de ampliar su uso como sustratos alternativos y apreciar su efecto en el crecimiento vegetativo de plantas *in vitro* de caña de azúcar del cultivar C1051-73, en fase de aclimatación *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el área destinada a la fase de aclimatación (umbráculo), de la Biofábrica de caña de azúcar, ubicada en la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA), del centro de Villa Clara. Se estableció un experimento en diseño, completamente al azar, los sustratos utilizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción y procedencia de los sustratos empleados

Sustratos	Descripción	Procedencia de los materiales
I	80 % de compost + 20 % de zeolita (control)	Compost: UEB Ifraín Alfonso, en Ranchuelo y Zeolita fábrica ubicada en Tasajera, Ranchuelo. Villa Clara.
II	80 % del residuo sólido obtenido del biogás a partir de vinaza + 20 % de zeolita	Residuo sólido: Biogás ubicado en la UEB Heriberto Duquesne, en Remedios, Villa Clara y Zeolita fábrica ubicada en Tasajera. Ranchuelo. Villa Clara.
III	80 % de Agromena + 20 % del residuo sólido obtenido del biogás a partir de vinaza.	Agromena: Fábrica ubicada en Tasajera, Ranchuelo. Villa Clara y Biogás ubicado en la UEB Heriberto Duquesne, en Remedios. Villa Clara.
IV	80 % de mezcla mineral + 20 % del residuo sólido obtenido del biogás a partir de vinaza.	Mezcla mineral: Complejo de materiales de la construcción Pepito Tey. Cienfuegos y Biogás ubicado en la UEB Heriberto Duquesne. Remedios, Villa Clara.

Se emplearon plantas *in vitro*, del cultivar de caña de azúcar C1051-73, con 15 días de cultivo, en medio de cultivo de enraizamiento propuesto por Jiménez (13), una altura entre 3.8-4.5 cm y con 3-4 hojas. Estas se trasplantaron a bandejas plásticas de 60 alveolos, con capacidad cada uno para 143 cm³ de sustrato, la cantidad de sustrato a emplear, fue calculada a partir del peso de estos. Estas permanecieron en condiciones de umbráculo, cubierto con una malla sombra de color negro (sarán), que permitió la reducción de la intensidad luminosa, al 50 %; la frecuencia de riego con microaspersores fue de dos veces al día, durante 5 minutos. Para cada sustrato empleado se estableció una bandeja, con 60 plantas *in vitro*.

Los sustratos utilizados se caracterizaron para conocer su composición química. Se les determinó: pH; contenido de materia orgánica y macroelementos totales (nitrógeno, fósforo y potasio). Los métodos empleados fueron los siguientes: Método potenciométrico (pH); Método de Walkey-Black (digestión húmeda) para la determinación de materia orgánica y Método de Kjeldahl para nitrógeno, fósforo y potasio total. Nitrógeno con recogida en ácido bórico y mezcla de indicadores; fósforo por colorimetría, con formación del complejo amarillo metavanadato - molibdicó y potasio total por fotometría de llama, según INICA (14).

Las plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro*, durante el tiempo que duró el experimento, se seleccionaron según el manual de procedimientos establecido por Montes de Oca *et al.* (15). Este experimento se inició en diciembre de 2020 y concluyó en febrero de 2021, para una duración de 60 días, acorde con la época en que se estableció (invierno).

A los 25 días del trasplante se evaluó la supervivencia y a los 60 días de cultivo, fueron seleccionadas 10 plantas por tratamiento, para evaluar la altura y el diámetro del tallo, número de hojas totales, activas e inactivas, largo y ancho de la hoja +1 y longitud de la raíz. Además, se determinó el número de las plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro*, existentes y dañadas en cada tratamiento, a la edad de dos meses y la formación del cepellón.

Análisis estadístico

Los datos de las variables analizadas se procesaron con el empleo del paquete estadístico *Statgraphics plus* (versión 5.1). Para determinar si las muestras procedían de una distribución normal, en cada variable analizada, se calcularon los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados. La comparación entre las medias fue a través de la alternativa paramétrica del análisis de varianza y las diferencias se determinaron con la prueba Tukey para $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización química de los sustratos

De los sustratos utilizados durante la investigación, se puede apreciar con relación al pH, que los dos primeros poseen un grado de acidez neutro, ubicados entre 6.0-6.5, mientras que los restantes lo presentan básico. El contenido de materia orgánica resulta elevado en los dos primeros, en relación con el resto de los tratamientos que es muy bajo (tabla 2).

Todos los sustratos evaluados aportan nutrientes, se destacan por su mayor aporte el compost y el residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza. Estos resultados coinciden con lo informado por Arzola *et al.* (16), en la caracterización del compost producido de la cachaza de caña de azúcar (sustrato I) y de la vinaza, material que da origen al sustrato II, utilizado durante el trabajo.

Los resultados obtenidos en la caracterización de los dos primeros sustratos, con relación al pH, se corresponden con valores similares a los informados por Garbanzo y Vargas (17). Con relación a la materia orgánica, Villegas *et al.* (18) plantearon que es un componente activo y su incorporación

Tabla 2. Caracterización de los sustratos para la aclimatación de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73) en condiciones *ex vitro* (base masa seca)

Material empleado en el sustrato (80 %)	pH	MO	N	P	K
		(%)			
I- Compost	6.5	24.15	1.04	0.25	0.30
II- Residuo sólido obtenido del biogás. a partir de vinaza	6.9	34.15	2.00	0.60	0.44
III- Agromena (cachaza: 10 %. gallinaza: 10 %. roca fosfórica: 70 % y zeolita: 10 %)	8.5	0.12	0.01	0.54	0.03
IV- Mezcla mineral (zeolita: 22 %; ceniza: 56 % y carbonato de calcio: 22 %)	11.6	0.41	0.00	0.03	0.01

con los diferentes materiales en los sustratos mejora el espacio poroso, incrementa la retención de humedad y capacidad de intercambio catiónico. Los sustratos empleados garantizaron más de un 60 % de supervivencia, los mayores porcentajes se presentaron en los sustratos I y II (92 %).

Efecto de los diferentes sustratos en el crecimiento vegetativo de las plantas *in vitro*

Altura de las plantas *in vitro*

Al evaluar la altura de las plantas *in vitro*, en condiciones *ex vitro*, se apreciaron diferencias significativas entre los sustratos evaluados; se alcanzaron los mejores resultados en los sustratos I y II; es decir, el control y el que contempla el 80 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza + 20 % de zeolita (figura 1).

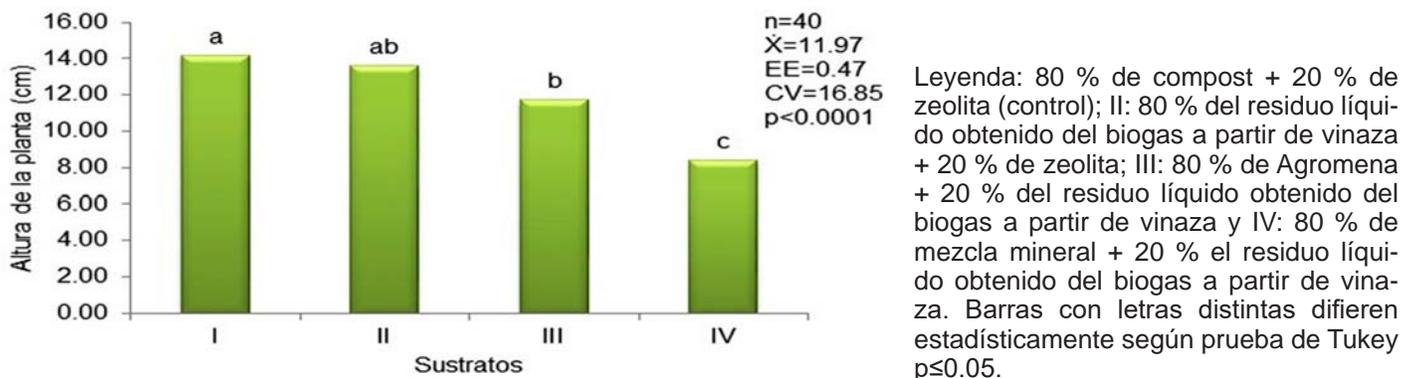


Figura 1. Efectos de los diferentes sustratos en la altura de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73), a los 60 días de cultivo.

En tal sentido, Ortiz (19) informó el mayor efecto a las combinaciones de los sustratos (cachaza, humus y compost) con litonita en las plántulas en condiciones *ex vitro* que alcanzaron mayor altura. Las evaluaciones realizadas a los 15 y 45 días, evidenciaron la existencia de un efecto importante de la composición del sustrato con la respuesta de las plantas *in vitro*, en condiciones *ex vitro*. Las plantas *ex vitro*, superaron los valores establecidos, para este indicador, por Hernández *et al.* (20).

Diámetro del tallo

Al evaluar el diámetro del tallo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (figura 2), pues los primeros tres tratamientos no difieren entre sí y muestran los mejores resultados, mientras que el sustrato IV (80 % de mezcla mineral + 20 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza), brindó los valores más bajos, lo que pudiera estar asociado a la com-

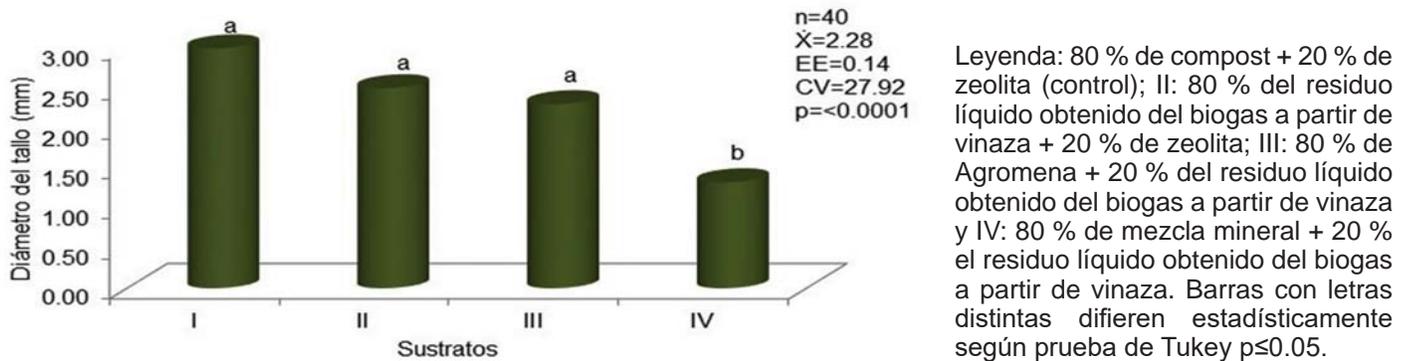
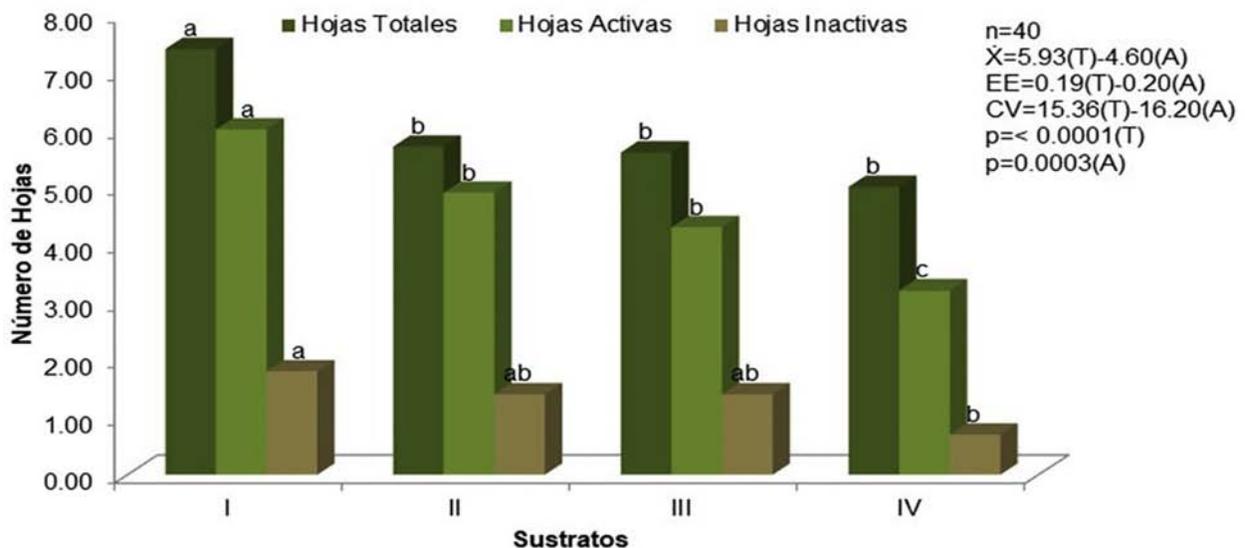


Figura 2. Efectos de los diferentes sustratos en el diámetro del tallo de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73) a los 60 días de cultivo.

posición química del sustrato, al poseer un pH básico, valores más bajos de materia orgánica y de macronutrientes notifican De León y González (21).

Número de hojas totales, activas e inactivas

Al evaluar el número de hojas totales, activas e inactivas, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, pues los mayores valores se mostraron en el sustrato I o control, mientras que el menor número de hojas inactivas lo alcanzó el tratamiento que contempla 80 % de mezcla mineral + 20 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza (figura 3). Sin embargo, en trabajos anteriores no se han detectado diferencias significativas entre los diferentes sustratos empleados para este indicador, según Pineda *et al.* (12).



Leyenda: 80 % de compost + 20 % de zeolita (control); II: 80 % del residuo líquido obtenido del biogas a partir de vinaza + 20 % de zeolita; III: 80 % de Agromena + 20 % del residuo líquido obtenido del biogas a partir de vinaza y IV: 80 % de mezcla mineral + 20 % el residuo líquido obtenido del biogas a partir de vinaza. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según prueba de Tukey $p\leq 0.05$.

Figura 3. Efecto de los diferentes sustratos en las variables hojas totales, activas e inactivas, de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73) a los 60 días de cultivo.

Largo y ancho de la hoja +1

Al evaluar el largo de la hoja +1, se verificaron diferencias significativas, entre los cuatro sustratos empleados para el desarrollo de estas las plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro*. El control (I) y

tratamiento con el 80 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza + 20 % de zeolita, mostraron los mejores resultados, mientras se observó que los valores más bajos correspondieron al tratamiento que contiene el 80 % de mezcla mineral + 20 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza. (figura 4).

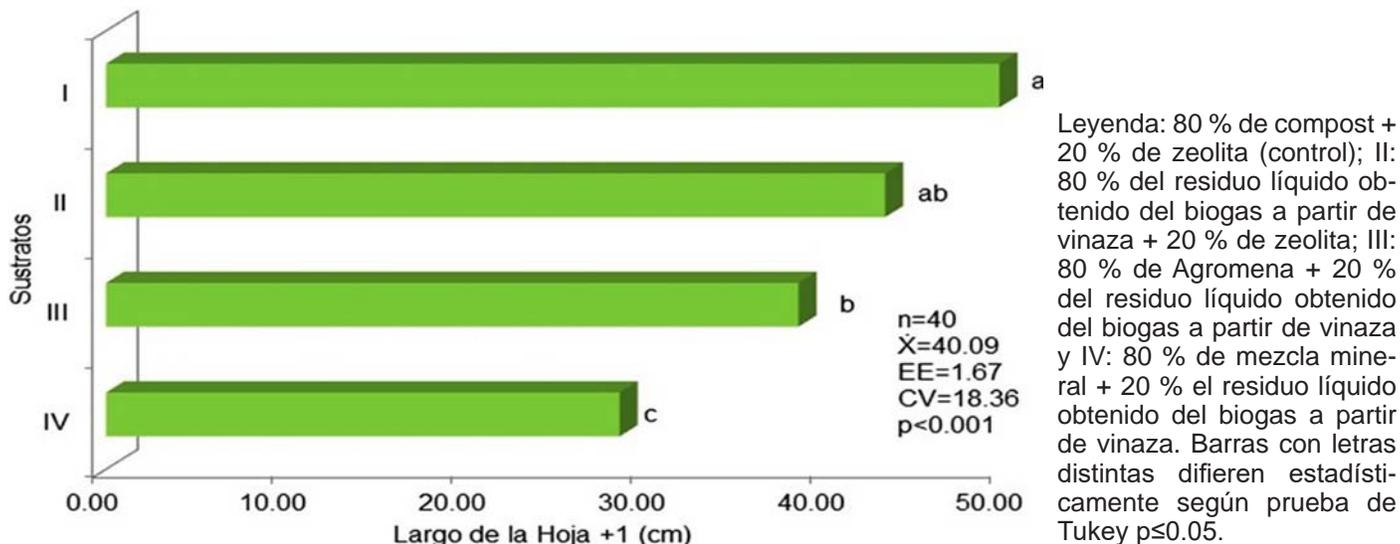


Figura 4. Efecto de los diferentes sustratos en la variable largo de la hoja +1 de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73), a los 60 días de cultivo.

En el caso de la evaluación relacionada con el ancho de la hoja +1, se detectaron diferencias entre los tratamientos evaluados. Los mejores resultados correspondieron a los tratamientos con 80 % de compost + 20 % de zeolita (control) y 80 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza + 20 % de zeolita (sustrato II), que se muestra en la figura 5. Esto corrobora los resultados obtenidos por Pineda *et al.* (12) en cuanto al uso del residuo sólido del biogás, a partir de vinaza en otros porcentajes mezclado con zeolita y sólo.

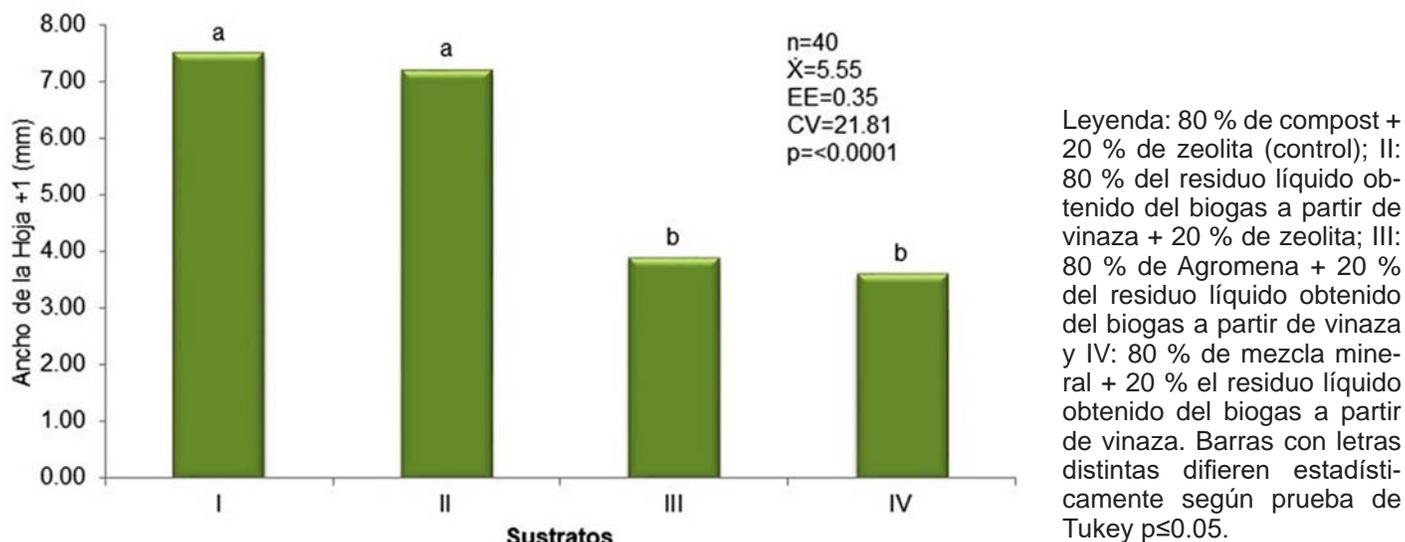
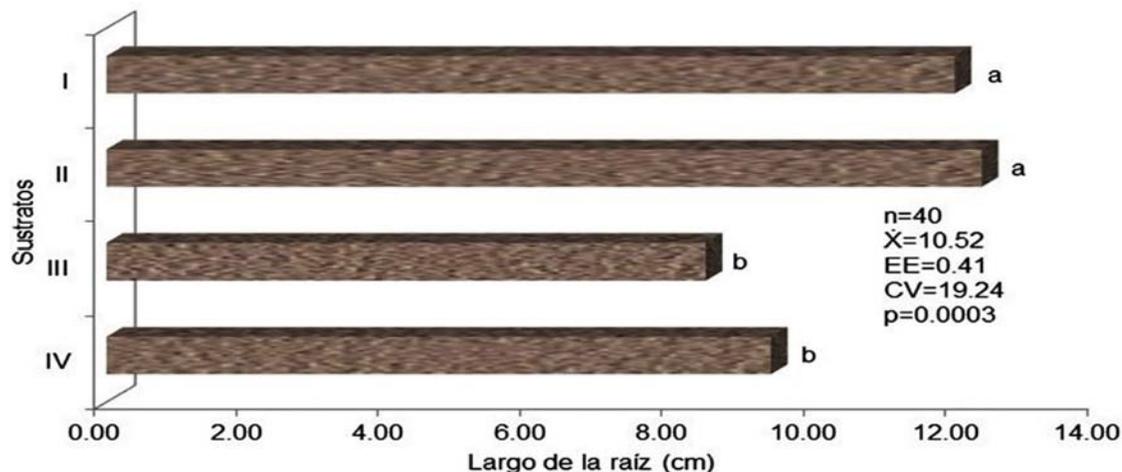


Figura 5. Efecto de los diferentes sustratos en la variable ancho de la hoja +1 de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73), a los 60 días de cultivo.

Longitud de la raíz

En este indicador se observaron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos evaluados, los mejores resultados correspondieron a los tratamientos en los que se emplearon 80 % de compost + 20 % de zeolita (control) y como sustrato II el 80 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza + 20 % de zeolita, como se muestra en la figura 6.



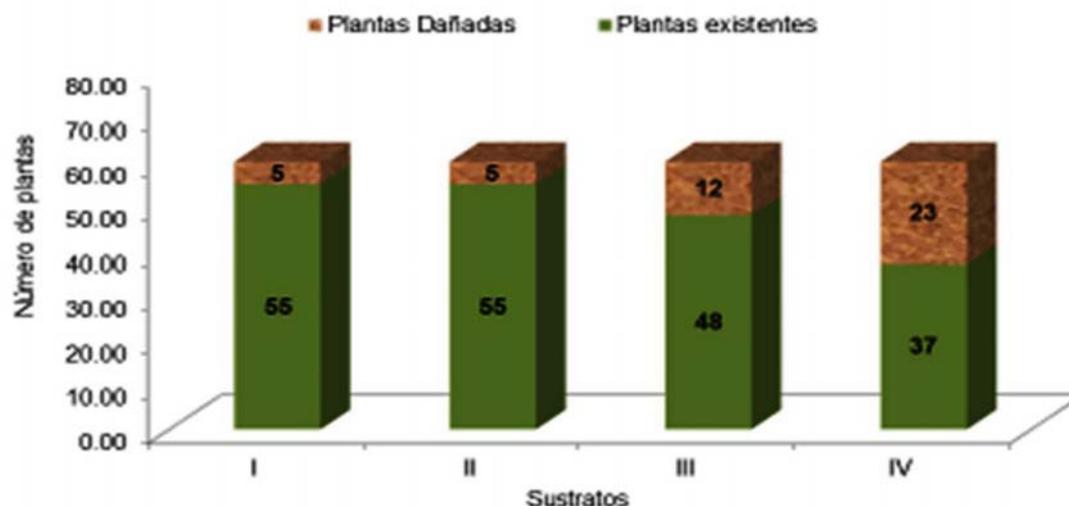
Leyenda: 80 % de compost + 20 % de zeolita (control); II: 80 % del residuo líquido obtenido del biogás a partir de vinaza + 20 % de zeolita; III: 80 % de Agromena + 20 % del residuo líquido obtenido del biogás a partir de vinaza y IV: 80 % de mezcla mineral + 20 % el residuo líquido obtenido del biogás a partir de vinaza. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

Figura 6. Efecto de los diferentes sustratos en longitud de la raíz de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73), a los 60 días de cultivo.

Autores como Preece y Sutter (22) y Rodríguez (23), plantearon que lo más importante en la fase de aclimatación es que las plantas *in vitro*, en condiciones *ex vitro*, formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá mucho tiempo y, en gran parte, de la efectividad de sus raíces. También, Díaz *et al.* (11), encontraron diferencias al comparar otros sustratos con la variante de compost y zeolita, desde el primer muestreo realizado.

Plantas *in vitro* existentes y dañadas

Respecto al número de plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro*, existentes al cumplir 60 días de cultivo, se alcanzó un mayor número de plantas sin daños en los sustratos I y II y menor en el resto de los tratamientos y viceversa para los dañados (figura 7). Estos resultados demuestran la factibili-



Leyenda: 80 % de compost + 20 % de zeolita (control); II: 80 % del residuo líquido obtenido del biogás a partir de vinaza + 20 % de zeolita; III: 80 % de Agromena + 20 % del residuo líquido obtenido del biogás a partir de vinaza y IV: 80 % de mezcla mineral + 20 % el residuo líquido obtenido del biogás a partir de vinaza. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

Figura 7. Efecto de los diferentes sustratos en la cantidad por categorías de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C1051-73), en condiciones *ex vitro*, a los 60 días de cultivo.

dad del uso de uno u otro sustrato, como indicaron Agramonte *et al.* (24), al referirse a la posibilidad de usos de diferentes sustratos en la fase de aclimatación.

Formación del cepellón

En el caso de la formación del cepellón, en el muestreo destructivo realizado a los 60 días de montado el experimento se pudo apreciar, como muestra la figura 8, que en todos los casos los materiales empleados y sus mezclas, facilitaron la formación del cepellón con las características necesarias para las plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro* en esta fase de aclimatación.

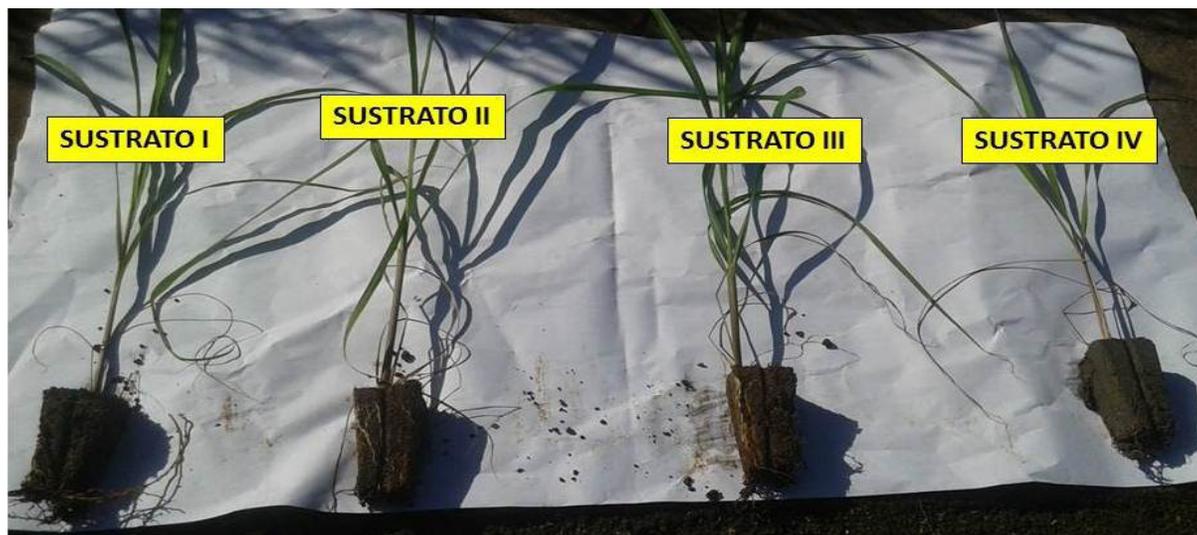


Figura 8. Formación del cepellón por los diferentes sustratos a los 60 días de cultivo.

Leyenda: 80 % de compost + 20 % de zeolita (control); II: 80 % del residuo líquido obtenido del biogas a partir de vinaza + 20 % de zeolita; III: 80 % de Agromena + 20 % del residuo líquido obtenido del biogas a partir de vinaza y IV: 80 % de mezcla mineral + 20 % el residuo líquido obtenido del biogas a partir de vinaza. Barras con letras distintas difieren estadísticamente según prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

Tabla 3. Resultado integral alcanzado por los distintos sustratos durante la aclimatación *ex vitro* de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp. cv. C1051-73*)

Variables	Sustratos			
	I	II	III	IV
Altura (cm)	14.17 a	13.61 ab	11.72 b	8.39 c
Diámetro (mm)	3.00 a	2.50 a	2.30 a	1.32 b
Hojas totales	7.40 a	5.70 b	5.60 b	5.00 b
Hojas activas	6.00 a	4.90 b	4.30 b	3.20 c
Hojas inactivas	1.80 a	1.40 ab	1.40 ab	0.70 b
Largo hoja +1 (cm)	49.76 a	43.40 ab	38.57 b	28.61 c
Ancho hoja +1 (mm)	7.50 a	7.20 a	3.88 b	3.60 b
Longitud raíz (cm)	11.95 a	12.33 a	8.44 b	9.36 b
Plantas existentes	55	55	48	37
Plantas dañadas	5	5	12	23
Cepellón	Bien	Bien	Bien	Bien

Medias con letras no comunes dentro de la misma fila difieren estadísticamente, según prueba de Tukey para $p \leq 0.05$.

Al evaluar de forma integral cada uno de los sustratos utilizados en la presente investigación, las diferencias estadísticas en cada una de las variables evaluadas y/o visualizadas (tabla 3), se observa, que el sustrato que puede convertirse como alternativo para ser utilizado en la fase de aclimatación para las plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro*, para el cultivo de la caña de azúcar, en específico en el cultivar C1051-73 es el sustrato II, que contempla 80 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza + 20 % de zeolita.

CONCLUSIONES

- Los sustratos que mostraron una caracterización química más balanceada resultaron el (80 % de compost + 20 % de zeolita o control) y el II (80 % del residuo sólido obtenido del biogás a partir de vinaza + 20 % de zeolita) y favorecieron el desarrollo de las plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro* en la fase de aclimatación, para el cultivar C 1051-73.
- Los mejores resultados de forma general e integral se alcanzaron en el I (80 % de compost + 20 % de zeolita o control) y el II (80 % del residuo sólido obtenido del biogás a partir de vinaza + 20 % de zeolita).
- De los sustratos evaluados resultó el II (80 % del residuo sólido obtenido del biogás, a partir de vinaza + 20 % de zeolita) la propuesta como sustrato alternativo, para ser empleado en el desarrollo de plantas *in vitro* en condiciones *ex vitro* de aclimatación, por mostrar resultados similares al control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wekesa, R.; Onguso, J.M.; Nyende, B.A.; Wamocho, L. S. Sugarcane *in Vitro* Culture Technology: Applications for Kenya's Sugar Industry. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 5(17): p.127-133. 2015.
2. Aragón, C.E.; Carvalho, L.C.; González, J.; Escalona, M.; Amâncio, S. Sugarcane (*Saccharum* sp. *hibridum*) Propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. *Tropical Plant Biology*. 2: p. 38-50. 2009.
3. Santana, I.; Rodríguez, J.; Nodarse, O.; Bernal, A.; Monte de Oca, J.L.; Jiménez, M.; Machado, P.; *et al.*, Biofábrica de 5^{ta} generación. *Revista ATAM, México*. 10 p. Septiembre. 2014.
4. Chandra, S.; Bandopadhyay, R.; Kumar, V.; Chandra, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett*. 32(9): p.1199-205. 2010
5. Chacón, A.; Gabriela, L.; Gómez S; Torres, F. Aclimatización de plántulas de Yambí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas *in vitro*. *Agronomía costarricense*, 29 (3): p.47 - 58. 2005.
6. Cedeño, G.; Macías, J. Multiplicación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad perolera, a partir de meristemas apicales (Tesis de pregrado, Ingeniería Agronómica). p.45. 2018.
7. Cetré, M.; Fernández, J.; Corozo, L. Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento vegetativo de vitroplantas de piña (*Anana comosus* L. Merr) var. Perolera. *La Técnica. Revista de las Agrociencias. Agricultura y Silvicultura. Edición Especial. Ecuador*. P. 21-32. Octubre, 2020.
8. Jo-García, M.; Hernández, R.; Estévez, M. Extracto de Aloe vera L. en la adaptación de vitroplantas de plátano. *Avances*, 22. (1): 110-122. 2020.
9. García, I.; Sánchez, I.; Núñez, D.; Otero, Y. Control químico de arvenses durante la aclimatización de plantas *in vitro* de caña de azúcar cv. 'CP52-43'. *Biología Vegetal* Vol. 16, No. 3: p 171 - 177. 2016
10. Cortegaza, L. Guía para la micropropagación *in vitro* de caña de azúcar. *Memoria del Congreso Internacional. Diversificación*, p.40. 2013.
11. Díaz, L.; Medina, L.; Latife, J.; Digonzelli, P. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. *INTA. Argentina, RIA*, 33 (2): p.115-128, 2004.
12. Pineda, E.; Acosta, F.; Fernández, I.; Núñez, D.; Hernández, A.; Aday, O.; *et al.*, 2018. Nuevo sustrato para la aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar. *Revista Centro Agrícola. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas*. Vol.45, No.3, 32-36, julio-septiembre, 2018.
13. Jiménez, E. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. p 93. 1995.

14. INICA. Manual de prácticas de laboratorio y campo. Instituto de Investigaciones de la caña de azúcar, 242 p. 2015.
15. Montes de Oca, J.; Jiménez, M.; Machado, P.; Occeguera, Z.; Bernal, A.; Nodarse, O., et al., Manual para el manejo agronómico de vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum spp*) en bancos de semilla básica o registrada. Cuba, p.30.2013.
16. Arzola, N.; Fundora, O.; De Mello, R. Manejo de suelos para una agricultura sostenible. Brasil. Editorial Jaboticabal: FCA/UNESP. Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal. 509 p., 2013.
17. Garbanzo, G.; Vargas, M. Determinación fisicoquímicas de diez mezclas de sustratos para producción de almácigos, Guanacaste, Costa Rica Inter Sedes: Revista de las Sedes Regionales, vol. XV, núm. 30, p. 151-168 Universidad de Costa Rica Ciudad Universitaria Carlos Monge Alfaro, Costa Rica. 2014.
18. Villegas, O.; Domínguez, M.; Albarera, H.; Martínez, M.; Cortés, M.; Castillo, et al., Sustrato como material de última generación, Ed. Omnia Science, Morelos, México. 62 p. 2017.
19. Ortiz, R. Factores que afectan el desarrollo de las vitroplantas de caña de azúcar en la fase adaptativa. INCA. ISBN 959-7023-12-1. 40p. 2000.
20. Hernández, A.; Machado, C.; Occeguera, Z.; Reyes, C.; Bernal, A. Requisitos de calidad para vitroplantas procedentes de una biofábrica. Centro Agrícola, 41(4): p.39-43. 2014.
21. De León, M.; González, M. Informe impreso. Resultados de análisis a muestras de la mezcla obtenida a partir de ceniza de *dichrostachys cinerea* (marabú) de Ciro Redondo en Ciego de Ávila; zeolita del yacimiento de Tasajeras, Villa Clara y carbonado de calcio de la Calera del Complejo de Materiales Pepito Tey. p 3. 2020.
22. Preece, J.; Sutter, E. Acclimatización of micropropagated plants to greenhouse and field in Debergh, P.C; Zimmerman, R.H. (Eds). Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic. Dordrecht, p. 71-93. 1991.
23. Rodríguez, R. Desarrollo de sustratos para vitroplantas en fase de aclimatación. Trabajo de Diploma. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Santa Clara, Cuba, p. 36. 1999.
24. Agramonte, D.; Jiménez, F.; Dita, M. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Capítulo 11. Aclimatización p.11. 1998.