

RESPUESTA AL ABONO DE HORMIGA ARRIERA (*Atta* spp.) COMO SUSTRATO EN LA ACLIMATACIÓN DE VITROPLANTAS

[RESPONSE OF ARRIERA ANT (*Atta* spp.) FERTILIZER AS A SUBSTRATE TO VITROPLANTS ACCLIMATION]

Néstor Camargo-Campos^{1§}, Viridiana Hernández-Martínez¹; Carlos Arias-Castro²; Martha Alicia Rodríguez-Mendiola²; Fredy Mera-Zúñiga¹; Héctor Armando Díaz-Méndez¹, Federico Francisco-Martínez¹, Fortunato Jiménez-Cruz¹

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tecomatlán. Km 19.5 Carretera Palomas-Tlapa. C.P. 74870. Tecomatlán, Puebla. ²Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10, carretera Tlajomulco. C.P. 45640. Circuito Metropolitano Sur, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. México.

§Autor para correspondencia (nextum262305@gmail.com).

RESUMEN

La fase de aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* es una etapa fundamental para determinar el éxito o fracaso en su supervivencia y adaptación, siendo el factor más importante el uso de un buen sustrato (orgánico, inorgánico o combinados) que permita el desarrollo de las mismas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de vitroplantas de diferentes especies (*Cucumis sativus*, *Capsicum annuum* var. Antonio y Naranja, *Ocinicum basilicum* y *Lycopersicon esculentum*) al abono de hormiga arriera (*Atta* spp.). El abono se obtuvo de tres diferentes colectas (M1 San Francisco Jalapexco; M2 Tecomatlán; M3 Tlajomulco de Zúñiga). En la etapa de aclimatación se utilizaron las siguientes formulaciones del sustrato: M1 (12 g) + *peat moss* y agrolita (70-30%); M2 (12 g) + *peat moss* y agrolita (70-30%); M3 (12 g) + *peat moss* y agrolita (70-30%), para el suministro de nutrimentos. Las evaluaciones realizadas fueron: % de supervivencia, número de hojas, altura de la planta, diámetro del tallo y área foliar. Se obtuvo una supervivencia $\geq 80\%$ en la mayoría de las especies (excepto *L. esculentum*), b) las vitroplantas tuvieron una mayor adaptabilidad con el uso de la M1, siendo *C. sativus* y *O. basilicum* las especies con mejor desarrollo vegetativo.

Palabras clave: Abono, aclimatación, sustrato, vitroplantas.

ABSTRACT

The acclimatization phase of plants from *in vitro* culture is a fundamental stage for success or failure in survival and adaptation of vitroplants, the most important factor being the use of a good substrate (organic, inorganic or combined) that allows good development of them. The objective of this work was to evaluate the response of vitroplants from different species (*Cucumis Sativus*, *Capsicum annuum* Var. Antonio and Orange, *Ocinicum basilicum* and *Lycopersicon esculentum*) to the fertilizer of ant arriera (*Atta* spp.). The fertilizer obtained from three different collections (M1 San Francisco Jalapexco; M2 Tecomatlán; M3 Tlajomulco de Zúñiga), was used in the acclimatization stage, as a substrate component in a single proportion: M1 (12 g) + *peat moss* and *agrolite* (70-30%); M2 (12 g) + *peat moss* and *agrolite* (70-30%); M3 (12g) + *peat moss* and *agrolite* (70-30%), for the supply of nutrients. The following evaluations were made: % survival, number of leaves, height, stem diameter and leaf area. A survival $\geq 80\%$ was achieved in most species (except *L. esculentum*), in addition, the vitroplants showed greater adaptability with the use of M1, being *C. sativus* and *O. basilicum* the species that showed the best developing.

Keywords: Compost, acclimatization, substrate, vitroplants.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología vegetal principalmente mediante el cultivo *in vitro*, ha demostrado ser una herramienta competitiva en relación con los métodos de propagación tradicionales Montes Cruz *et al.* (2016), ya que ofrece la posibilidad de multiplicar masivamente genotipos valiosos incluyendo las hortalizas, teniendo beneficios específicos, entre los que destacan la obtención de plántulas en cualquier época del año, su almacenamiento en poco espacio (la cantidad de vitroplantas varía según la especie), producción libre de contaminación, enfermedades y plagas, obtención de plántulas mejoradas, propagación de especies de difícil reproducción por otros métodos, entre otros (Rivas, 2016; Arellano, 2021).

El proceso de los cultivos *in vitro* consta de cinco etapas principales: selección de la especie, el establecimiento del cultivo, desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, enraizamiento y la aclimatación (Arellano, 2021). Sin embargo, se considera que la última, es la que determina el éxito o el fracaso de todo el proceso (Silva *et al.*, 2017). Esta afirmación se base en el hecho que en las primeras fases las plántulas son manejadas en laboratorio y bajo condiciones controladas, mientras que durante la aclimatación hay condiciones de menor humedad relativa, mayor variación de temperatura, alta irradiación y menor disponibilidad de nutrimentos, por lo que se debe considerar: 1. su establecimiento dentro de un invernadero o bajo una protección; 2. usar sustratos con buena retención de humedad, buen drenaje y aireación; 3. mantener la temperatura en el rango de 15 a 28 °C; 4. cambiar de manera gradual de alta (90%) a menor (40-60%) humedad relativa en el transcurso de 30 a 50 días; 5. incrementar la radiación solar de 50% al inicio a radiación solar plena; y 6. abastecimiento adecuado de nutrimentos (Yescas *et al.*, 2016). Es importante enfatizar que el uso de un buen sustrato y su composición es uno de los factores más importantes para lograr con éxito la etapa de aclimatación de la planta (Espinoza *et al.*, 2019).

El abono de hormiga arriera (*Atta* spp.) es un recurso potencial para la fertilización orgánica en áreas hortícolas, esto abre la posibilidad de aprovechamiento del mismo en distintas regiones agrícolas. Investigaciones previas han demostrado que el abono de la hormiga arriera tiene una composición mejor para fertilización que otros abonos orgánicos convencionales, tales como el estiércol de vacuno, la gallinaza, el estiércol de cerdo, la paja de arroz, la pulpa de café y la cachaza, mostrando buen contenido de N, K y Ca (Fortanelli-Servín, 2002). Además, en el abono de hormiga arriera se encuentran presentes microorganismos (bacterias y hongos) que participan en la transformación de la materia orgánica (MO), así como en otros procesos biológicos como la fijación de N₂ atmosférico (Pinto *et al.*, 2009). En este trabajo se evalúa la respuesta en el desarrollo fenológico de vitroplantas en la fase de aclimatación, a la incorporación de abono de hormiga arriera, como componente del sustrato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El experimento se llevó a cabo durante el periodo de agosto-diciembre de 2019, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, ubicado en el Km 10 de la carretera Tlajomulco San Miguel Cuyutlán, Jalisco, México.

Recolección de muestras

Los hormigueros fueron previamente localizados en las diferentes zonas de interés, durante el verano de 2019. La recolección se llevó a cabo en tres hormigueros: el primero (M1), ubicado en la localidad de San Francisco Jalapexco/Teopantlán, Puebla, con las coordenadas (GMS) 18° 50' 22"N O 98° 17' 58"O, a 2000 msnm, el segundo (M2), en el municipio de Tecmatlán, Puebla; 18°06'55"N 98°18'50"O, a 920 msnm, y el tercero (M3), en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco; 20°28'25"N 103°26'35"O, a 1,579 msnm.

La muestra fue recolectada en un radio de 20 cm a partir de la entrada del hormiguero y en los primeros 10 cm de profundidad, retirando el exceso de hojarasca de la vegetación. Enseguida se realizó la homogenización del residuo reciente (1 a 5 cm) y del más humificado (5 a 10 cm), recolectando un total de muestra de aproximadamente 2 kg por hormiguero, colocándolas en bolsas con cierre hermético. Finalmente, las muestras fueron tamizadas en un tamiz 2.7*2.7 mm (2,830 micras), y almacenadas en refrigeración.

Análisis y acondicionamiento de las muestras de abono de hormiga arriera (*Atta* spp.)

Las muestras de abono fueron esterilizadas mediante calor húmedo utilizando autoclave marca All American^R modelo 1941X, durante 20 min a 120 °C y una presión de 15-20 psi, y posteriormente liofilizadas. A los sustratos preparados conteniendo M1, M2 y M3, se les midió pH, conductividad eléctrica (CE), porcentaje de humedad (% H), y se ajustó a un pH de 6-7 con H₂SO₄ 1M.

Material vegetal

Las vitroplantas fueron proporcionadas por la Dra. Martha Alicia Rodríguez Mendiola, responsable del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Tlajomulco (ITT), después de la desinfección y germinación de las semillas *in vitro*, así como de su incubación en frascos de cultivo en la Biofábrica del ITT durante 45 días. Las vitroplantas proporcionadas fueron de pepino (*C. sativus*), albahaca (*O. basilicum*), jitomate (*L. esculentum*) y chile morrón Var. Antonio y Naranja (*C. annuum*).

Trasplante de las vitroplantas

Las vitroplantas fueron extraídas de los frascos de cultivo *in vitro*, y se lavaron cuidadosamente, para eliminar el medio semisólido con Gelrite. Enseguida se trasplantaron a tubetes de plástico desinfectados con hipoclorito de sodio 1% v/v, conteniendo los tres diferentes sustratos. En cada tubete se trasplantó cuidadosamente, una vitroplanta, 10 de cada especie.

Los tubetes con las plántulas fueron colocados en una charola de unicel, cubiertas con una charola de plástico transparente, con perforaciones, para permitir la aireación y disminución gradual de la humedad relativa (HR) hasta 70±5%, una temperatura de 25±2 °C y luz LED de 120-130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 8/16 h luz/oscuridad. Las plántulas se regaron cada dos días con 5 ml de agua destilada.

Tratamientos

Para los tratamientos se usó el abono de *Atta* spp., combinado con agrolita (a) y *peat moss* (pms) de uso comercial, en una proporción de 70:30, respectivamente. Los tres tratamientos contenían 12 g de los abonos a evaluar. De esta forma los tratamientos fueron: T1 (M1), T2 (M2) y T3 (M3), tres repeticiones y un testigo por cada especie.

Variables medibles

El registro de los datos se llevó a cabo una semana después del trasplante, y durante las tres semanas siguientes. Se contó número de hojas por planta, altura de la planta, diámetro del tallo y área foliar. Para esta última variable se tomó la medida directa de las dimensiones del largo y ancho de la hoja como se propone en Espinoza *et al.* (2019), posteriormente, el área de hoja para la especie de *C. Sativus* se calculó mediante un procedimiento derivado de Robbins y Pharr (1987), con la fórmula:

$$AF = 0.6189 \times Am^{1.9965}$$

Donde:

AF = Área foliar

AM = Ancho máximo de la hoja.

Mientras que para las especies de *C. annuum* y *O. basilicum* se implementó la siguiente formula:

$$AF = 0,003 + 0,0073X$$

Donde:

X= Largo por ancho de las hojas, acorde a lo propuesto por Pentón *et al.* (2006), debido a la forma de la hoja en estas especies.

Supervivencia (%)

Para su evaluación se usó la fórmula propuesta por Espinoza *et al.* (2019).

$$\text{Supervivencia} = \frac{NPV}{NTP} \times 100$$

Donde:

NPV: Número de vitroplantas vivas

NTP: Número total de vitroplantas trasplantadas.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2x2, resultado de la evaluación de dos factores, donde el factor A corresponde a la especie (*C. sativus*, *O. basilicum*, *C. annuum* y *L. esculentum*) y el factor B a las muestras del abono de hormiga arriera recolectado (M1, M2, M3). Las evaluaciones se llevaron a cabo en las cuatro especies de vitroplantas, y los tres tipos de sustratos, más el control. El análisis estadístico se realizó con el software SAS 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de supervivencia

La supervivencia de las vitroplantas tuvo un promedio de general de 74%. Los mejores resultados se obtuvieron con el morrón var. Naranja y la albahaca (100% de supervivencia); seguidos del morrón var. Antonio (90%), pepino (80%) y jitomate (0%) (Figura 1).

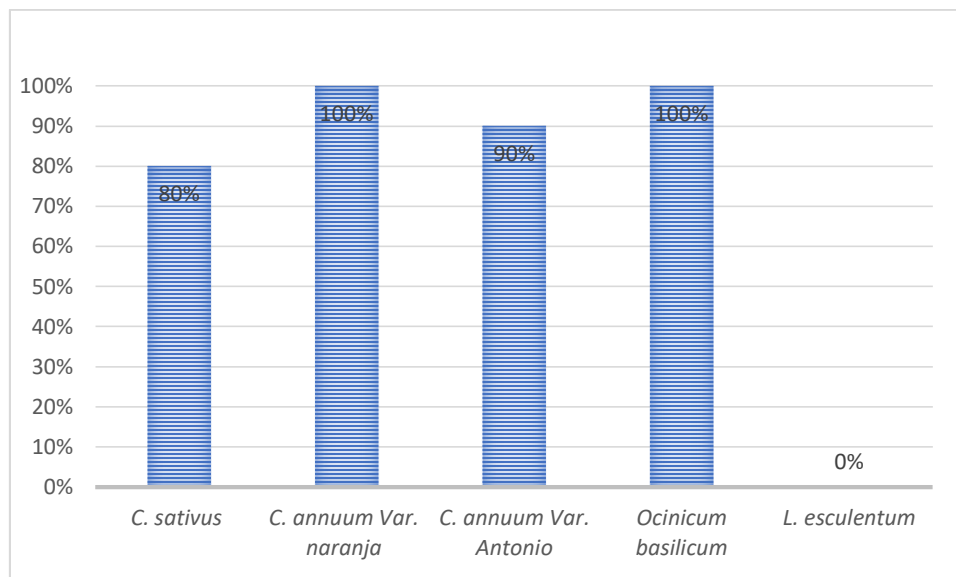


Figura 1. Efecto la composición general del abono de hormiga arriera (*Atta* spp.), en el porcentaje de supervivencia de vitroplantas.

Probablemente, la nula sobrevivencia de las vitroplantas de jitomate se puede atribuir no al sustrato utilizado, si no al tamaño y la calidad de la planta trasplantada. Las vitroplantas de tomate presentaron una gruesa capa de cera e indicios de pudrición (color café) en la parte superior y las hojas inferiores, debido a la rápida elongación del tallo, lo que provocó que la parte superior de la plántula estuviera en contacto con la tapa del frasco provocándole daños en el ápice. Espinoza *et al.* (2019), mencionan que se debe considerar altamente el tamaño y la calidad de la vitroplanta. Para esto se deben seleccionar (clasificar) las que presenten un buen desarrollo al momento de ser trasplantada al sustrato, en la etapa de aclimatación (Sánchez *et al.*, 2012), los tamaños recomendables para ser trasplantadas pueden diferir según la especie. Valores de 1.5 a 2.5 cm de altura son recomendables para especies como la (*Morus alba* L.) (Espinoza *et al.*, 2019).

Palhares *et al.* (2004), al evaluar la influencia del tamaño de las plantas *in vitro*, durante la aclimatación de *Eucalyptus urograndis*, obtenidas en sistemas de inmersión temporal, obtuvieron el mayor porcentaje de supervivencia (63 %), y así como en los de desarrollo vegetativo (longitud, número de hojas y número de raíces emitidas), con las plántulas con menores tallas. Los autores concluyeron que, al parecer, no es la talla la variable que tiene mayor efecto en la supervivencia de las plántulas de *E. urograndis* durante la aclimatación, sino la calidad de los diferentes órganos que la conforman.

Por otra parte, los valores alcanzados en las demás especies no disminuyen del 80% siendo considerado como un rango de aceptable-alto (Gil *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2012). Estos valores también pudieran estar asociados al manejo y las condiciones en la cuales se mantuvieron la plantas durante la aclimatación: 1. la humedad adecuada que se garantizó por la frecuencia y el tipo de riego de manera manual; 2. la cantidad de agua suministrada que permitió una buena aireación en el sustrato, ya que este puede ser muy propenso a la lixiviación y al almacenamiento de humedad, si se agrega demasiada; 3. la cobertura de plástico permitió mantener una temperatura promedio adecuada; y, 4. la cantidad de luz suministrada por las lámparas LED.

Cabe destacar que, para aumentar el porcentaje de supervivencia de las plántulas, el abono fue esterilizado para eliminar microorganismos patógenos, debido a que, al ser un material de origen natural, puede estar propenso a seguirse descomponiendo (Mendoza *et al.*, 2011), por la presencia de

microorganismos (principalmente hongos) (Victorero-Fueyo, 2018; Mueller *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos son indicadores de que las plántulas fueron capaces de superar los cambios de cultivo en condiciones *in vitro* (condición heterótrofa), a las condiciones naturales (autótrofas). Resultados parecidos a los reportados por Osuna y Saucedo (2010), durante la propagación *in vitro* de vid variedad Globo Rojo, donde se alcanzó un promedio de 90% de supervivencia.

Influencia del abono de *Atta* spp. en la supervivencia de vitroplantas

Está bien demostrado que el tipo de sustrato es uno de los factores más influyentes en la aclimatación de las vitroplantas (Espinoza *et al.*, 2019); su composición y estructura proporciona una adecuada retención de humedad para proveer a la planta de agua y nutrientes.

Factor especie

Para la variable altura se observó diferencia estadística significativa, siendo el pepino el que destacó con 8.93 ± 2.51 cm, en tanto que el morrón Antonio fue el de menor valor con 3.43 ± 0.94 . De igual forma en la variable del diámetro del tallo sobresale nuevamente la especie de pepino con 0.30 ± 0 , mientras que para el número de hojas se presentaron dos grupos estadísticamente diferentes, siendo la albahaca y el pepino los más destacables con 5.62 ± 1.16 y 10.70 ± 2.4 , respectivamente. El área foliar fue significativamente mayor en las especies de pepino con 11.57 ± 3.46 y la albahaca con 5.70 ± 1.75 (Cuadro 1). Esto se puede atribuir a la forma y el tamaño mayor de la hoja, que son propios de las especies.

Cuadro 1. Respuesta de la especie con respecto a la altura, diámetro del tallo, número de hojas, área foliar.

Especie	Altura (cm)	Hojas/planta (No)	Diámetro de tallo (cm)	Área foliar (cm ²)
Pepino	8.93 ± 2.51 a	5.62 ± 1.16 b	0.30 ± 0 a	11.57 ± 3.46 a
Morrón naranja	5.40 ± 1.29 b	6.40 ± 1.26 b	0.20 ± 0 b	3.18 ± 0.58 c
Morrón Antonio	3.43 ± 0.94 c	5.66 ± 1.73 b	0.20 ± 0 b	3.07 ± 1.76 c
Albahaca	5.56 ± 0.89 b	10.70 ± 2.41 a	0.20 ± 0 b	5.70 ± 1.75 b
DSM	1.75	2.18	0	1.58

Medias con letras diferentes en una misma columna para cada variable presentan diferencia estadística, según la Prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Factor tratamiento

El abono de hormiga arriera tuvo un efecto significativo en el crecimiento y desarrollo de las plántulas. En la variable altura se observó la formación de dos grupos estadísticamente diferentes, sobresaliendo la colecta M1 (6.61 ± 2.54) y el testigo (6.65 ± 2.95). Se alcanzaron valores significativamente diferentes con la M1 en el diámetro del tallo (0.22 ± 0.05), mientras que en la variable diámetro de área foliar el testigo fue superior con 7.29 ± 6.78 seguido por la M1 con 6.25 ± 2.89 (Cuadro 2).

Estos resultados coinciden con los reportados por Izquierdo *et al.* (2002), quienes, al evaluar el suministro de cachaza al sustrato, durante la aclimatación de microbulbillos de ajo, alcanzando los mejores valores de supervivencia y desarrollo en los tratamientos adicionados con cachaza, como fuente de materia orgánica.

En general, el abono M1 mostró ser considerablemente mejor en la mayoría de las variables medidas en cada especie. Estos resultados indican el efecto beneficioso de la inclusión de abono de hormiga en las mezclas de los sustratos, el nivel de pH presente en el abono también fue determinante, ya que M1 tuvo valores de $pH 7 \pm 1$.

Cuadro 2. Influencia del abono de hormiga arriera (*Atta* spp.), en el desarrollo fenológico de las plántulas en etapa de aclimatación.

Abono	Altura (cm)	Hojas por planta (No)	Diámetro del tallo (cm)	Área foliar (cm ²)
M1	6.61 ± 2.54 a	7.63 ± 2.29 ab	0.22 ± 0.05 a	6.25±2.89 ab
M2	5.83 ± 2.42 ab	6.58 ± 2.27 ab	0.22 ± 0.05 b	4.76±3.43 bc
M3	4.26 ± 1.31 b	7.90 ± 3.9 a	0.21 ± 0.03 d	4.06±2.75 c
T	6.65 ± 2.95 a	5.50 ± 1.91 b	0.22 ± 0.05 c	7.29± 6.78 a
DMS	1.92	2.39	0	1.63

Medias con letras diferentes en una misma columna para cada variable presentan diferencia estadística, según la Prueba de Tukey (p<0.05).

Cairo y Álvarez (2017) mencionan que añadir abono como un componente del sustrato, este contribuye a mejorar las propiedades biológicas y físico química, ya que resulta una importante fuente de nutrientes para el ecosistema edáfico. Indacochea *et al.* (2017) evaluaron la aclimatación de tres especies forestales en peligro de extinción empleando un sustrato compuesto por 40% de arena de río, 40% de humus de lombriz y 20% de aserrín de madera descompuesta. La aclimatación de las vitroplantas de las tres especies se logró en un periodo de diez semanas, con una supervivencia de 65, 80 y 70%, respectivamente; y las vitroplantas alcanzaron un tamaño entre 17.07 y 19.53 cm y un número de hojas por planta que varió entre 7 y 14.

Asimismo, Espinoza *et al.* (2019) reportan respuestas favorables durante la aclimatación de *Morus alba* L. usando estiércol vacuno como suplemento de nutrientes en los sustratos utilizados durante la aclimatación, logrando valores estadísticamente diferentes con la utilización de estiércol vacuno al 20 y 42%, lograron una supervivencia promedio del 80%, incremento en la longitud, número de hojas y tamaño de las mismas en la fase inicial de aclimatación.

Mientras que Sanchez *et al.* (2020), al evaluar cuatro líneas clonales (LC15s, LC26s, LC23b y LC24b) de *Agave angustifolia* en cuatro sustratos (testigo: arena, tierra lama y gravilla (3:1:1); tratamiento 1: turba: mezcla testigo (1:1); tratamiento 2: tierra de maceta: mezcla testigo (1:1) y tratamiento 3: turba: tierra de aceta: mezcla testigo (1:1:1), evaluaron altura, número de hojas y cobertura de los agaves después de 60 días, lograron la aclimatación de las vitroplantas con un 100% de supervivencia en todos los tratamientos, observando que el sustrato con mayor contenido de materia orgánica favoreció el enraizamiento y crecimiento radicular.

Cabe destacar que uno de los principales factores a considerar es la cantidad de abono que se debe utilizar al momento de generar el sustrato, debido a que este es propenso a seguirse degradando, con el riesgo de generar problemas de fitotoxicidad en las plantas. Adriano *et al.* (2013) investigaron el uso de compost durante la etapa de aclimatación de vitroplantas de banano, clon Gran enano, en bolsas de polietileno, los resultados indicaron que el desarrollo de las plantas fue inhibido en los sustratos con más de 30 % de compost, lo que se atribuyó a un posible efecto de fitotoxicidad causado por las características químicas de los sustratos.

CONCLUSIONES

El empleo de mezclas de sustrato conteniendo abono de hormiga arriera (*Atta* spp.), en la etapa de aclimatación de las diferentes especies de vitroplantas evaluadas, permitió alcanzar altos valores de supervivencia ≥80%. El abono M1 mostró valores estadísticamente superiores en altura y diámetro del tallo, mientras que el valor mayor de número de hojas se obtuvo con el abono M3. La respuesta al abono de

hormiga arriera, fue mejor en las especies de *C. sativus* y *O. basilicum*, ya que presentaron mayor adaptabilidad, evidenciado por la cantidad de hojas, tallo y raíz de las plantas adaptadas. La combinación de sustratos y abono es un factor determinante para lograr una alta supervivencia.

LITERATURA CITADA

- Adriano-Anaya, M.D., Y. Lara-Pérez, D.G. Ramos-Pérez, A. Vázquez-Ovando y M. Salvador-Figueroa. 2013. Uso de compost durante la etapa de aclimatación de vitroplantas de banano clon “Gran Enano” (*Musa* AAA). *Quehacer Científico en Chiapas*, 8(2), 61-67.
- Arellano, R. 2021. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Webimar Micropropagación.
- Cairo, C.P. and H.U. Álvarez. 2017. Efecto del estiércol en el suelo y en el cultivo de la soya (*Glycine max* L.) Merr. *Pastos y Forrajes*, 40(1), 37-42.
- Espinoza, R.Á., P.J. Silva, A.M. Bahi and C.D. Ramero. 2019. Influence of *in vitro* plant size and substrate type on the acclimatization of *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 42(1), 23-29.
- Fortanelli, M.J. y M.M. Servín. 2002. Desechos de hormiga arriera (*Atta mexicana* Smith), un abono orgánico para la producción hortícola. *Terra Latinoamericana*, 20 (2), 153-160.
- Gil, R.A., M.E. López y Z.A. López. 2017. Acclimation of *in vitro* seedlings of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “African violet” to greenhouse conditions. *Arnaldoa*, 24(1), 343-350. doi:<http://doi.org/10.22497/arnaldoa.241.24116>.
- Indacochea-Ganchozo, B., J. Parrales-Villacreses, C. Castro-Piguave, M. Vera-Tumbaco and J. Gabriel-Ortega. 2017. *In vitro* acclimatization of native forest species from Manabí southern in danger of extinction. *Selva Andina Res. Soc.* 8, 124-134.
- Izquierdo, H., Y. Quiñones, R. Disotuar y D. Pedroso. 2002. Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatación de vitroplantas y microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.). *Cultivos Tropicales*, 23(3), 63-69.
- Mendoza, H.D., D.L. García, R.M. Belda, F. Fornes y M. Abad. 2011. Compostaje y vermicompostaje de residuos hortícolas: evolución de parámetros físicos y químicos durante el proceso. Consecuencias ambientales. *Actas Hort.* 59, 22-27.
- Montes-Cruz, S., J.M. Lalama-Aguirre, J.M. Echeverría-Félix y S.M. Salazar-Torres. 2016. Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. *Dom. Cien* 216. 69-89.
- Mueller, U.G., T.R. Schultz, C.R. Currie, R.M. Adams and D. Malloch. 2001. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *The quarterly review of biology*, 76 (2), 169-176.
- Osuna, P. y C. Saucedo. 2010. Propagación *in vitro* de “vid” variedad Globo Rojo. Reportes Técnicos de Investigación. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez.
- Palhares, G.A., R. Rodríguez, M. Cid, D. Pina y J.J. González-Olmedo. 2004. Efecto de un análogo de brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 25(1):39-44.
- Pentón, G., D.L. Torres y G. Martín. 2006. Nota técnica: Estimación del área foliar a partir de observaciones morfológicas convencionales en *Morus alba* var. Acorazonada. *Pastos y Forrajes*, 29(3). 247 p.
- Pinto-Tomás, A.A., M.A. Anderson, G. Suen, D.M. Stevenson, F.S. Chu and C.R. Currie. 2009. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5956) (5956), 1120–1123. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1173036>.
- Rivas, C.G. 2016. Cultivo *in vitro* de células y tejido vegetal. *Serie Nutrición Vegetal* No. 59. Artículos Técnicos de INTAGRI. 5 p.
- Robbins, N.S. and D.M. Pharr. 1987. Leaf area prediction models for cucumber from linear measurements. *HortScience*, 22, 1264-1266.
- Sanchez, A., Z. Coronel-Lara, A. Gutiérrez, G. Vargas, M.L. Coronado and M. Esqueda. 2020. Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1593-1605.

- Sánchez, A., D. Saavedra y H. Mauricio. 2012. Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Rev. Palmas*, 33(4), 41:52.
- Silva, J.T., M.M. Hossain, J. Dobránszki, M. Sharma, J.C. Cardoso and S. Zeng. 2017. Aclimatización of *in vitro* derived Dendrobium. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 110-124.
- Victorero, T.C. and E.F. Fueyo. 2018. Simbiosis hormigas attine-hongos-actinomicetos. Recuperado el 24 de marzo de 2021. <https://www.researchgate.net/publication/324979201>.
- Yescas, A.E., G.V. Campos-Angeles, J.R. Enríquez-del Valle, V.A. Velasco-Velasco, G. Rodríguez-Ortiz y J. Ruiz-Luna. 2016. Aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol. 7(4). pp. 911-922