

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
CAMPUS TECNOLÓGICO LOCAL SAN CARLOS**

**PROPUESTA DE UN PROTOCOLO PARA LA ACLIMATACIÓN DE  
VITROPLANTAS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) BAJO  
CONDICIONES DE AMBIENTE CONTROLADO**

Trabajo Final de Graduación presentado a la  
Escuela de Agronomía como requisito parcial  
para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería  
en Agronomía

**JORGE ALONSO GÓMEZ SALGADO**



Carrera de Ingeniería en Agronomía  
Campus Tecnológico Local  
San Carlos  
2019 - 2023

**SANTA CLARA, SAN CARLOS**

**2022**

**PROPUESTA DE UN PROTOCOLO PARA LA ACLIMATACIÓN DE  
VITROPLANTAS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) BAJO  
CONDICIONES DE AMBIENTE CONTROLADO**

**JORGE ALONSO GÓMEZ SALGADO**

**Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:**

Ing. Agr. Sergio Torres Portuguez, M. Sc

\_\_\_\_\_  
Asesor principal

Ing. Agr. Arnoldo Gadea Rivas, M. Sc

\_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Biot. Fabián Echeverría Beirute, Ph. D.

\_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Agr. Carlos Ramírez, Ph. D.

\_\_\_\_\_  
Coordinador  
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Milton Villarreal Castro, Ph. D.

\_\_\_\_\_  
Director  
Escuela de Agronomía

**2022**

## **DEDICATORIA**

Primeramente, dedico este trabajo a Dios que me ha permitido alcanzar esta etapa y pese a los altos y bajos durante este proceso siempre a estado para guiarme y llenarme de fuerza para seguir adelante.

También dedico este trabajo a mi Familia que ha sido una parte muy importante como apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera extender mis más sinceros agradecimientos a Jaime Soto e Itsel Murillo por su extensiva colaboración durante la mayor parte de este trabajo.

También quisiera agradecer a mi asesor el Ing. Sergio Torres Portuguez, M.Sc, por abrirme las puertas para realizar este trabajo y por todo el apoyo brindado durante el proceso.

Agradezco profundamente a Ing. Wainer Ortiz, Ing. Reiner Fallas y Ing. Jose Andrés Rocha, quienes participaron en distintas fases de este proyecto.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria	i
Agradecimientos .....	ii
Índice de Contenido .....	iii
Lista de Cuadros.....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Objetivo General .....	4
1.2 Objetivos Específicos .....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Propagación vegetativa del cultivo de yuca .....	5
2.2 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	6
2.2.1 Medio de cultivo.....	7
2.2.2 Condiciones ambientales.....	7
2.3 Aclimatación de plantas <i>in vitro</i> .....	8
2.3.1 Condiciones <i>in vitro</i> en la aclimatación de yuca.....	8
2.3.2 Condiciones <i>ex vitro</i> en la aclimatación de yuca.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1 Ubicación del estudio .....	12
3.2 Período de estudio .....	13
3.3 Material experimental .....	13
3.4 Descripción de las corridas.....	14
3.5 Variables de respuesta .....	16
3.6. Diseño experimental y arreglo de tratamientos.....	16
3.7 Recolección de datos del ambiente .....	18
3.8 Análisis estadístico .....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Crecimiento Aéreo.....	19
4.1.1 Longitud del tallo.....	19
4.1.2 Grosor del tallo .....	20
4.1.3 Área foliar .....	21
4.1.4 Peso Fresco Aéreo .....	23
4.1.5 Número de Nudos.....	25
4.1.6 Número de hojas.....	27
4.2. Crecimiento radical.....	29
4.2.1 Peso fresco raíz.....	29
4.2.2 Longitud de la raíz más larga .....	31
4.2.3 Número de Raíces .....	33
4.3 Otras variables .....	35
4.3.1 Supervivencia .....	35
4.3.2 Optimización de los factores .....	37

4.3.3 Condiciones ambientales .....	39
4.4 Propuesta del protocolo de aclimatación .....	43
5. DISCUSIÓN .....	46
5.1 Crecimiento aéreo .....	46
5.2 Crecimiento radical.....	48
5.3 Supervivencia.....	49
6. CONCLUSIONES.....	51
7. RECOMENDACIONES .....	52
8. BIBLIOGRAFÍA .....	53

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Factores y sus niveles a evaluar durante el crecimiento <i>in vitro</i> y durante la aclimatación de vitroplantas de yuca.....	15
2	Diseño aleatorizado para la distribución de las corridas (- nivel alto, 0 punto medio, + nivel alto).....	18
3	Análisis de varianza de los factores principales para la variable longitud de tallo ( $\alpha = 0,05$ ). .....	19
4	Análisis de varianza de los factores principales para la variable grosor de tallo ( $\alpha = 0,05$ ). .....	21
5	Análisis de varianza de los factores estadísticamente significativos para la variable área foliar ( $\alpha = 0,05$ ). .....	22
6	Análisis de varianza de los factores principales para la variable peso fresco aéreo ( $\alpha = 0,05$ ). .....	24
7	Análisis de varianza de los factores principales para la variable número de nudos ( $\alpha = 0,05$ ). .....	26
8	Análisis de varianza de los factores principales para la variable número de hojas ( $\alpha = 0,05$ ). .....	28
9	Análisis de varianza de los factores principales para la variable peso fresco de la raíz ( $\alpha = 0,05$ ). .....	30
10	Análisis de varianza de los factores principales para la variable longitud de la raíz más larga ( $\alpha = 0,05$ ). .....	32
11	Análisis de varianza de los factores principales para la variable número de raíces ( $\alpha = 0,05$ ). .....	34
12	Análisis de varianza de los factores principales para la variable sobrevivencia ( $\alpha = 0,05$ ). .....	36
13	Parámetros de optimización para las variables peso fresco de raíz, peso fresco aéreo, área foliar, número de hojas, número de raíces y sobrevivencia para plántulas de yuca variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado. ....	37
14	Solución para los parámetros de optimización para los factores en estudio.....	38
15	Resumen de la temperatura y Humedad relativa registrada con los sensores de la cámara .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Cámara de ambiente controlado del Laboratorio de Biotecnología de plantas del Tecnológico de Costa Rica, Campus Local San Carlos. 2021 .....	<b>12</b>
<b>2</b>	Explantes nodales de 1 cm de longitud de plantas <i>in vitro</i> de yuca variedad Valencia. ....	<b>13</b>
<b>3</b>	Etapa de multiplicación del material madre de plantas <i>in vitro</i> de yuca variedad Valencia, Laboratorio de Biotecnología de plantas, Tecnológico de Costa Rica, Campus Local San Carlos, 2020. ....	<b>14</b>
<b>4</b>	Distribución de las plántulas en las bandejas para formar cada corrida. ....	<b>16</b>
<b>5</b>	Distribución aleatorizada de las corridas dentro de las cámaras de ambiente controlado. ....	<b>17</b>
<b>6</b>	Medias ajustadas de la longitud del tallo de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores edad de crecimiento y el porcentaje de sacarosa en el medio de cultivo. ....	<b>20</b>
<b>7</b>	Medias ajustadas del grosor del tallo de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de del factor tratamiento al sustrato. ....	<b>21</b>
<b>8</b>	Diagrama Pareto de efectos estandarizados de los factores estadísticamente significativos para la variable área foliar. ....	<b>22</b>
<b>9</b>	Efecto de los niveles de los factores estadísticamente significativos para la variable área foliar. ....	<b>23</b>
<b>10</b>	Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta del peso fresco aéreo de plántulas <i>in vitro</i> de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado. ....	<b>24</b>
<b>11</b>	Medias ajustadas del peso fresco aéreo de plántulas de yuca de la variedad Valencia para los efectos de los factores fotoperíodo, intensidad de luz, tratamiento al sustrato, edad de crecimiento concentración de sacarosa. ....	<b>25</b>
<b>12</b>	Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta para el número de nudos de plántulas <i>in vitro</i> de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado. ....	<b>26</b>
<b>13</b>	Medias ajustadas para el número de nudos de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores tratamiento al sustrato, edad de crecimiento, sección del explante concentración de sacarosa en el medio de cultivo. ....	<b>27</b>
<b>14</b>	Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta para el número de hojas de plántulas <i>in vitro</i> de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado. ....	<b>28</b>

<b>15</b>	Medias ajustadas del número de hojas de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores intensidad de luz, tratamiento al sustrato, edad de crecimiento y concentración de sacarosa en el medio de cultivo.....	<b>29</b>
<b>16</b>	Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta del peso fresco aéreo de plántulas <i>in vitro</i> de yuca variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.....	<b>30</b>
<b>17</b>	Medias ajustadas del peso fresco radical de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores intensidad de luz, tratamiento al sustrato y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. ....	<b>31</b>
<b>18</b>	Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta de la raíz más larga de plántulas <i>in vitro</i> de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.....	<b>32</b>
<b>19</b>	Medias ajustadas de la longitud de la raíz más larga de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores fotoperíodo, tratamiento al sustrato y concentración de sacarosa en el medio de cultivo. ....	<b>33</b>
<b>20</b>	Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta para el número raíces de plántulas <i>in vitro</i> de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.....	<b>34</b>
<b>21</b>	Medias ajustadas para el número de raíces en plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores fotoperíodo, regulador de crecimiento, tratamiento al sustrato y edad de crecimiento. ....	<b>35</b>
<b>22</b>	Medias ajustadas para la sobrevivencia de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de la concentración de sacarosa. ....	<b>36</b>
<b>23</b>	Gráfica de optimización para la aclimatación de plantas <i>in vitro</i> de yuca variedad Valencia bajo condiciones de ambiente controlado.....	<b>39</b>
<b>24</b>	Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en las corridas con intensidad de luz alta y fotoperíodo de 16 h de luz. ....	<b>41</b>
<b>25</b>	Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en la zana con intensidad de luz baja y fotoperíodo de 16 h de luz.....	<b>41</b>
<b>26</b>	Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en la zona con intensidad de luz alta y fotoperíodo de 8 h de luz.....	<b>42</b>
<b>27</b>	Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en la zona con intensidad de luz baja y fotoperíodo de 8 h de luz.....	<b>42</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un cultivo de gran relevancia a nivel mundial debido al área que es dedicada a su cultivo y al volumen de producción. Se destaca su importancia dado que presenta un excelente potencial de rendimiento, llegándose a obtener altos rendimientos incluso bajo condiciones marginales. Además, se trata de un cultivo con alta versatilidad, que se adapta distintos modelos de producción, grados de tecnificación y cuenta con tolerancia a la sequía y a suelos degradados (FAO 2013). El principal destino de la yuca es consumo humano, siendo sus raíces ricas en hidratos de carbono y sus hojas fuente de proteínas, minerales y vitaminas. Además, se utiliza para la elaboración de harina y almidón, productos horneados y para la alimentación animal (Aristizábal y Sánchez 2007).

En Costa Rica para el año 2020 el cultivo de yuca ocupaba 11 161,1 ha, siendo el segundo cultivo anual en importancia en cuanto a área siembra (INEC 2020). El valor medio de rendimiento del cultivo de yuca en Costa Rica para el año 2017 es de quince toneladas por hectárea (FAO 2019). Las exportaciones de yuca para el período 2018 alcanzaron \$86,6 millones, representando alrededor de un 3% de valor de las exportaciones agrícolas, lo que lo ubica como el cuarto producto agrícola de exportación de Costa Rica (Mora 2019).

La yuca es susceptible al ataque de diversas plagas y enfermedades que en muchos casos provocan pérdidas significativas. Una de las enfermedades que causa mayor impacto económico es la enfermedad de cuero de sapo (Aguilar *et al.* 2017). Esta enfermedad es causada probablemente por un fitoplasma, el cual es transmitido por insectos chupadores (mosca blanca y hemípteros) y su propagación en el campo se da tras la utilización de semilla proveniente de plantas enfermas (Gómez *et al.* 2015). Las pérdidas provocadas por esta enfermedad pueden llegar hasta 100% debido a que se afecta significativamente la calidad y la acumulación de almidón en las raíces de las plantas. El diagnóstico de la enfermedad puede hacerse a través de herramientas biotecnológicas y biología molecular (Valverde 2015), o bien, se da al momento de la cosecha de las raíces, cuando es posible

observar directamente los síntomas de daño en estas (Álvarez *et al.* 2015). La utilización de semilla libre de este patógeno es clave para el manejo de esta enfermedad.

La propagación tradicional de yuca se realiza mediante la propagación vegetativa o asexual, utilizando estacas del tallo principal de plantas maduras. Las estacas se cortan con una longitud de unos 25 cm a 30 cm de longitud y entre cinco y ocho yemas sanas (Aguilar *et al.* 2017). La propagación vegetativa suele ser la forma más utilizada por los agricultores, ya que resulta ser una forma fácil y económica de obtener semilla. No obstante, para que este método propagación sea eficiente es necesario contar con un material madre de alta calidad genética, fisiológica y fitosanitaria, en caso de que estas condiciones no se cumplan se presentará un bajo potencial de rendimiento de la semilla (Ospina *et al.* 2002). Algunas otras técnicas de propagación utilizados son la macropropagación por brotes axilares, la macropropagación por miniestacas y la micropropagación mediante el cultivo de tejidos *in vitro* en laboratorio (Aguilar *et al.* 2017).

El cultivo de tejidos de plantas *in vitro* se utiliza para diferentes propósitos; dentro de los que se destacan la multiplicación de material vegetal y la obtención plantas de forma acelerada a través de la micropropagación. Además, se emplea para procesos de mejoramiento genético, así como en la conservación de germoplasma. Otra aplicación importante en la que se utiliza es la obtención de plantas libre de virus y algunas otros patógenos a través aislamiento y cultivo de meristemas (Abdelnour y Vincent 1994). En el caso de la yuca se utiliza principalmente para la obtención y multiplicación plantas limpias de distintos virus y especialmente de la enfermedad cuero de sapo.

Durante el proceso de propagación *in vitro* las plantas se mantienen bajo un ambiente óptimo para su crecimiento, contando con un medio de cultivo con los nutrientes necesarios para que se desarrollen, intensidad de luz baja, alta humedad relativa y condiciones asépticas. Esta situación condiciona a las plantas a un desarrollo anormal a nivel morfológico, anatómico y fisiológico. Por lo tanto, es necesario someter las plantas a un proceso de aclimatación o adaptación para

asegurar la sobrevivencia a las condiciones *ex vitro*, ya sea que se dirijan a invernadero o a campo (Hazarika 2006).

El proceso de aclimatación de plantas *in vitro* tiende a ser el factor limitante en la producción masiva de plantas de cultivo de tejidos y requiere de la mayor inversión en labores y dinero. A su vez durante este proceso se puede presentar una alta mortalidad (22% – 97%) si el manejo de las plantas o las condiciones ambientales son desfavorables para estas (Jorge *et al.* 2000; Bonilla *et al.* 2015; Castañeda *et al.* 2017). Según el CIAT (2007), para tener un sistema eficiente de aclimatación de plantas se necesita establecer una serie de etapas que incluyen desde labores preoperacionales, como el entrenamiento del personal y el acondicionamiento de las instalaciones, hasta las propias de operación como selección y pre-acondicionamiento de las vitroplantas, el trasplante, el mantenimiento, la separación y finalmente el traslado al campo.

Actualmente el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Campus Tecnológico Local San Carlos no tiene definido un protocolo para la aclimatación de clones *in vitro* de yuca. Esto ha provocado que se presenten problemas en esta etapa del programa de propagación de plantas de este cultivo, principalmente asociados a alta mortalidad y desuniformidad en los distintos lotes que se someten al proceso de aclimatación. Con este trabajo se pretenderá revelar el efecto de los principales factores que tienen influencia en la aclimatación de vitroplantas de yuca. Una vez que se conozcan cuales factores tiene mayor influencia en este proceso, se propondrá un protocolo para la aclimatación eficiente de plantas *in vitro* de yuca, para las condiciones e instalaciones con las que cuenta el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Instituto Tecnológico de Costa Rica Campus Local San Carlos.

## **1.1 Objetivo General**

Desarrollar un protocolo para la aclimatación de vitroplantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz var. Valencia) bajo condiciones de ambiente controlado.

## **1.2 Objetivos Específicos**

1. Evaluar el comportamiento de vitroplantas de yuca de la variedad Valencia durante el proceso de aclimatación

2. Evaluar el efecto de los siguientes factores: intensidad de la luz, fotoperíodo, tipo de auxina, tratamiento al sustrato, concentración de sacarosa en el medio de cultivo, sección del explante y la edad de crecimiento *in vitro*, sobre la sobrevivencia y el crecimiento de plantas *in vitro* de yuca variedad Valencia durante el proceso de aclimatación.

3. Generar un protocolo para la aclimatación de vitroplantas de yuca de la variedad Valencia bajo condiciones de ambiente controlado.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Propagación vegetativa del cultivo de yuca

La propagación de la yuca se hace de forma asexual, comúnmente a través de secciones de su tallo de un tamaño que oscila entre 20 cm y 25 cm de longitud y con cinco a ocho yemas por estaca (Aguilar *et al.* 2017). Para obtener éxito en la producción bajo esta técnica de propagación las estacas seleccionadas deben proceder de plantas maduras y es preferible prescindir de estacas de tallos jóvenes, dado a que tienden a ser muy tiernos y succulentos, de igual forma con la utilización de tallos muy viejos se suele observar una baja viabilidad de los brotes y poco vigor en los brotes resultantes. Bajo esta técnica de propagación la tasa de multiplicación suele ser reducida, alcanzando valores entre 10 veces y 20 veces del área sembrada, en el mejor de los casos (Cock *et al.* 1976).

Otro sistema alternativo es la macro propagación por mini estacas. Esta técnica ofrece la ventaja de acelerar el proceso de propagación presentando una tasa de multiplicación hasta 60 veces mayor que la propagación convencional por estacas (Aguilar *et al.* 2017). En el caso de esta técnica, se emplean mini estacas de dos nudos, de las cuales se llegan a obtener hasta ocho retoños. Una vez que los retoños alcancen un tamaño adecuado son cortados y puestos a enraizar. Bajo esta técnica la tasa de multiplicación de hasta 1200 veces del material madre en un año (Cock *et al.* 1976).

La micropropagación en la yuca es una técnica ampliamente utilizada en la multiplicación masiva de material vegetal élite libre de enfermedades sistémicas de manera exitosa (Castañeda *et al.* 2017). Así mismo, el cultivo de tejidos en yuca es ampliamente utilizado para la conservación de germoplasma y el intercambio internacional del mismo. Bajo la técnica de micropropagación se puede incrementar aceleradamente la cantidad de semilla élite en una región, indiferentemente de las condiciones ambientales, en períodos cortos de tiempo, de manera uniforme y en un espacio reducido (Aguilar *et al.* 2017). Su tasa de multiplicación puede llegar hasta las 17 000 plantas en un año a partir de un explante nodal (Shiji *et al.* 2014).

## 2.2 Cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica ampliamente utilizada en la actualidad. Los primeros intentos de cultivo de tejidos se atribuyen a Gottlieb Haberlandt, quien reportó sus estudios y resultados en el año 1902. Aunque su trabajo no fue del todo exitoso, se le considera pionero y fundador del dogma central de la biotecnología vegetal. Su aporte principal fue proponer que era posible cultivar células aisladas de una planta en un medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para su mantenimiento y desarrollo, dando origen a la hipótesis de la totipotencia celular en plantas (Laimer y Rücker 2003).

Actualmente existe numerosa información sobre el cultivo de tejidos vegetales y es posible encontrar extensa documentación acerca de las distintas variaciones de la técnica y sus diversas aplicaciones (Castillo 2008). Dentro de las principales aplicaciones se encuentran los estudios básicos relacionados a fisiología, genética y bioquímica, bioconversión y producción de compuestos de utilidad, incremento de la variabilidad genética, conservación e intercambio de germoplasma, obtención de plantas libres de patógenos y la propagación de plantas (Mroginski y Roca 1991). Las principales aplicaciones del cultivo de tejidos en yuca son el mejoramiento genético a través de embriogénesis somática (Mongomake *et al.* 2015), la limpieza de material contaminado con patógenos, principalmente de virus y la enfermedad cuero de sapo (Carvalho *et al.* 2017; Maruthi *et al.* 2019); propagación acelerada de genotipos de alto valor (Castañeda *et al.* 2017).

La propagación clonal o micropropagación es una de las aplicaciones más utilizadas del cultivo *in vitro*. Al través de la micropropagación se obtiene descendencia uniforme y genéticamente idéntica de una planta madre con características de interés. De esta forma, se obtienen clones a partir de un explante el cual requiere de un ambiente químico óptimo en función de la composición del medio de cultivo y pH y de un ambiente físico regido esencialmente por la temperatura, fotoperíodo, intensidad lumínica y humedad (Castillo 2008).

### **2.2.1 Medio de cultivo**

La composición del medio de cultivo al que se someten los explantes es esencial para su adecuado desarrollo. En la actualidad existe un gran número de formulaciones para medios de cultivo las cuales contemplan entre 15 y 35 compuestos químicos. Los componentes esenciales en el medio son agua destilada desionizada, carbono, nutrimentos minerales y vitaminas. El carbono se utiliza como fuente energética para los explantes, dado que en esta etapa su alimentación es principalmente heterótrofa. Las vitaminas y las sales minerales se utilizan para satisfacer las necesidades nutritivas de vitroplantas. Las sales minerales al mismo tiempo cumplen una función en la regulación de la salinidad del medio, lo cual determina la tasa de absorción de nutrientes (Dixon y Gonzales 1994). Adicionalmente, es común el uso un agente gelificante (en caso de medios semisólidos), reguladores de crecimiento y algunos otros compuestos como aminoácidos, ácidos orgánicos, factores de crecimiento y sustancias antioxidantes, sin embargo, la utilización estos compontes varían en función del tipo de cultivo y de la especie a tratar (Mroginski y Roca 1991).

### **2.2.2 Condiciones ambientales**

Las condiciones ambientales durante el proceso de multiplicación y crecimiento *in vitro* deben ser controladas. Durante esta etapa los factores que se deben considerar la luz, la temperatura y la humedad relativa (Murashige 1977). Dentro del factor luz se ha caracterizado el efecto de la intensidad lumínica (Jorge *et al.* 2000) y el efecto de las longitudes de onda (Naranjo & Fallas 2018). El fotoperíodo durante esta etapa suele ajustarse a 16 horas de luz (Murashige 1977; Jorge *et al.* 2000; Bonilla *et al.* 2015; Naranjo & Fallas 2018). En cuanto a la temperatura, para cultivos tropicales generalmente se maneja una temperatura constante que va desde los 24 °C hasta los 27 °C (Murashige 1977; Aguilar *et al.* 2017). En el trópico es común observar problemas asociados con la proliferación de hongos y otros microorganismos dada la alta humedad relativa, por esta razón se recomienda utilizar des humidificadores y el cierre hermético de los frascos de cultivo (Murashige 1977).

## **2.3 Aclimatación de plantas *in vitro***

La aclimatación de plantas *in vitro* de yuca es el cuello de botella en la multiplicación de semilla proveniente del cultivo de tejido. Durante la etapa *in vitro* la mortalidad y pérdidas suelen ser muy bajas, sin embargo, de estas plantas se llegan a perder hasta el 90% de estas cuando no se manejan adecuadamente las condiciones edafoclimáticas (Bonilla *et al.* 2015). La aclimatación de plantas depende tanto de las condiciones de crecimiento *in vitro* (Jorge *et al.* 2000; Zimmerman *et al.* 2007; Shiji *et al.* 2014), como las condiciones *ex vitro* a las que se someten (Pospisilová *et al.* 1999; Jorge *et al.* 2000; Bonilla *et al.* 2015).

### **2.3.1 Condiciones *in vitro* en la aclimatación de yuca**

Las condiciones de crecimiento *in vitro* tienen un efecto sobre el comportamiento morfológico, anatómico y fisiológico de las vitroplantas de yuca (Pospisilová *et al.* 1999). Algunos de los cambios anatómicos y fisiológicos que se observan en las plantas *in vitro* se reflejan en la estructura de la hoja, las relaciones hídricas y en los parámetros fotosintéticos. Los principales cambios en la estructura de la hoja de una vitroplanta son un menor grosor de la hoja, poca diferenciación del mesófilo de la hoja y una menor cantidad de cloroplastos que una planta convencional. En el caso de las relaciones hídricas, las vitroplantas suelen ser muy susceptibles al marchitamiento asociado a la alta conductancia estomática, una deficiente funcionalidad de los estomas y una alta permeabilidad de la cutícula y epicutícula. En cuanto a los parámetros fotosintéticos, las plantas *in vitro* suelen presentar concentraciones de clorofila a y b inferiores que las plantas aclimatadas a condiciones *ex vitro*, lo cual se refleja una menor tasa fotosintética en las vitroplantas (Pospisilová *et al.* 1999).

Estos cambios condicionan a las plantas a requerir de un período de aclimatación paulatino para recuperar parte de las funciones les brindan resistencia a los cambios en las condiciones ambientales. El crecimiento excesivo de las vitroplantas de yuca puede llegar a ser perjudicial en el proceso de aclimatación, dado a que hace que las plantas lleguen a sufrir una mayor mortalidad *ex vitro* (Jorge *et al.* 2000). Por esta razón, es necesario controlar los factores que influyen en el

crecimiento de las vitroplantas de tal manera que se obtengan plantas aptas para una exitosa aclimatación de estas.

La concentración de sacarosa en el medio de cultivo influye sobre el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas. Cuando la concentración de sacarosa es menor a 2% el crecimiento y desarrollo de las plantas es limitado. De igual forma, concentraciones de sacarosa superiores a 6% en el medio son perjudiciales para el desarrollo de las vitroplantas de yuca (Zimmerman *et al.* 2007). Otros factores que se han mencionado como importantes son el período de crecimiento *in vitro* y la sección de la planta de la que proviene el explante. En el caso de estos factores no se encuentran precedentes que evalúen empíricamente el efecto de estos sobre el crecimiento de las vitroplantas de yuca, aunque Jorge *et al.* (2000), menciona que los explantes que provienen de los ápices tienden a crecer más rápido los explantes nodales.

### **2.3.2 Condiciones *ex vitro* en la aclimatación de yuca**

Las condiciones ambientales *in vitro* bajo las que se desarrollan las plantas de yuca son muy especiales y diferentes a lo que se presentan bajo condiciones *ex vitro*. Durante las primeras semanas fuera del recipiente, las plántulas de yuca son muy susceptibles al ataque de microorganismos y al marchitamiento debido a que cuentan con baja conductividad hidráulica de las raíces y débiles conexiones entre las raíces y el tallo, así como una elevada conductancia estomática (Posoisilova 1999). Por lo tanto, es necesario proveerle a las plantas un ambiente que limite el desarrollo de patógenos y que le permita acondicionarse anatómica, morfológica y fisiológicamente al ambiente *ex vitro*.

Los factores ambientales con más influencia sobre la aclimatación de las plántulas de yuca son la temperatura, la humedad relativa y la luz (Jorge *et al* 2000). Estos tres factores influyen considerablemente sobre la transpiración de las plantas, de tal forma que, a mayor temperatura, mayor cantidad de luz y a menor humedad relativa se presente una mayor transpiración por parte de las plantas, lo que hace que estas sean más susceptibles al marchitamiento. Por este motivo las plantas

deben permanecer en cámaras húmedas de plástico que reduzcan el potencial de transpiración de las plantas (CIAT 2007).

En cuanto al factor luz, el efecto de la intensidad lumínica ha sido estudiado por Jorge *et al.* (2000), quien encontró un efecto perjudicial en el incremento de la intensidad lumínica sobre la sobrevivencia de las plántulas de yuca. Cuando las plántulas se mantuvieron con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de  $380 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  se presentó una sobrevivencia del 78%, muy superior que al que se alcanzaron con una DFFF de  $540 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  y  $900 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ , las cuales apenas registraron cifras de 45% de sobrevivencia y 3% de sobrevivencia respectivamente. En el caso del fotoperíodo no se encuentran registros de estudios previos sobre el efecto de este factor sobre la aclimatación de plántulas de yuca.

El desarrollo de raíces funcionales es primordial durante el proceso de aclimatación. De esta forma, es necesario proveerle las condiciones que promuevan un enraizamiento rápido y eficiente de las plántulas. Las propuestas en este ámbito se han enfocado en el uso de diferentes sustratos (Bonnilla *et al.* 2015; Naranjo & Fallas 2018), en el uso de reguladores de crecimiento (Shiji *et al.* 2014; Naranjo & Fallas 2018) y en el uso de microorganismos benéficos (Azcón *et al.* 1997). Una práctica de manejo en este ámbito es la recomendada por Yoon *et al.* (2001), la cual consiste en realizar una poda en la base de las raíces y tratar las plantas como un tipo de esqueje, con lo cual se puede aumentar la sobrevivencia y facilitar el manejo de las plántulas. Bajo esta técnica las raíces podadas vuelven a formarse entre los siete y diez días después del trasplante.

Los sustratos que mejores resultados presentan cuentan con las características físicas de alta porosidad, lo cual facilita el drenaje, pero que cuente con una buena retención de humedad. Algunos sustratos orgánicos parecen ser una buena alternativa, llegando a presentar sobrevivencias hasta de 80% (Bonnilla *et al.* 2015). De igual manera algunas opciones como la fibra de coco, la turba y la combinación de fibra de coco y turba en proporción 50%:50% han mostrado ser muy eficientes en mostrar alta sobrevivencia (94%, 91% y 86% respectivamente), además de favorecer en el enraizamiento de las plántulas de yuca, en comparación

con otros sustratos como arena y mezcla de suelo con arena, las cuales presentaron 60% de sobrevivencia y 42% respectivamente (Naranjo & Fallas 2018).

El uso de micorrizas y de reguladores de crecimiento puede mejorar considerablemente la sobrevivencia de las plántulas de yuca durante la aclimatación. Por su parte, Azcón *et al.* (1997), encontró que con el uso de micorrizas se puede aumentar hasta en un 20% la sobrevivencia de las plántulas, aunque la respuesta depende del clon o variedad de yuca y del tipo de microorganismo empleado. De igual forma, el efecto de los reguladores de crecimiento de tipo auxinas ha mejorado la sobrevivencia de las plántulas de yuca durante el proceso de aclimatación, dado al incremento en el desarrollo radicular de estas. De esta forma, Shiji *et al.* (2014) encontró que el uso de ácido naftalenacético (ANA) en el medio de cultivo *in vitro* incrementó la sobrevivencia de las plántulas durante el proceso de aclimatación respecto al uso de ácido indolbutírico (AIB) y que utilizar el medio de cultivo regulador de crecimiento. De igual forma, Naranjo & Fallas (2018) encontraron que la dosis del regulador de crecimiento ácido indolbutírico tiene un efecto sobre el enraizamiento de plántulas de yuca provenientes de miniesquejes de plántulas *in vitro*, presentándose un mejor desarrollo cuando se emplea AIB con una concentración de 1000 partes por millón.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación del estudio

El presente estudio se realizó en el módulo de ambiente controlado del Laboratorio de Biotecnología del ITCR, Campus Tecnológico Local San Carlos, Alajuela, Costa Rica. Dicho módulo cuenta con cuatro cámaras de dos y medio metros de ancho por seis metros de largo, resultando en un área de quince metros cuadrados cada una (Figura 1). Cada cámara cuenta con riego por microaspersión, aire acondicionado, humidificador, ventilador, calefactor y lámparas led Heliospectra LX602C, además de cuenta con sensores de humedad relativa, temperatura y CO<sub>2</sub>.



**Figura 1.** Cámara de ambiente controlado del Laboratorio de Biotecnología de plantas del Tecnológico de Costa Rica, Campus Local San Carlos. 2021

El monitoreo y el control de los componentes de control ambiental de la cámara se hicieron a través de la conexión de una estación meteorológica modelo WatchDog y los sensores internos con el software Climate Manager™. Dicho software recopiló la información y la envió las señales a los componentes de control ambiental para establecer las condiciones programadas dentro de las cámaras.

### 3.2 Período de estudio

El periodo de estudio inició en el mes de mayo del año 2020 con la preparación de medio de cultivo y el subcultivo de vitroplantas disponibles en banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos. Posteriormente se realizaron subcultivos de propagación de material en los meses de junio, julio y agosto cada uno a las cuatro semanas de edad. Posteriormente se procedió con el experimento de cribado, iniciando el día 3 de septiembre con la primera siembra de corridas *in vitro*. Se continuo con la fase de aclimatación *ex vitro* para el día 20 de octubre y se finalizó con la última toma de datos con plantas enraizadas el día 04 de noviembre de 2020.

### 3.3 Material experimental

El material experimental utilizado en esta investigación fue vitroplantas de clones de yuca de la variedad Valencia. A partir de estas plantas, se les extrajo explantes nodales (microestacas) de 1 cm de longitud (Figura 2). Éstos se colocaron sobre un medio de cultivo MS + 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y se mantuvieron por cinco semanas en cuarto crecimiento bajo condiciones controlada de temperatura (26 °C ± 1 °C constantes), fotoperíodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y luminosidad media (2300 lux, lampara fluorescente 5700k) (Figura 3).



**Figura 2.** Explantes nodales de 1 cm de longitud de plantas *in vitro* de yuca variedad Valencia.



**Figura 3.** Etapa de multiplicación del material madre de plantas *in vitro* de yuca variedad Valencia, Laboratorio de Biotecnología de plantas, Tecnológico de Costa Rica, Campus Local San Carlos, 2020.

### 3.4 Descripción de las corridas

Las corridas se llevaron a cabo mediante la conjunción de siete factores con sus distintos niveles. Se tomaron en cuenta tres factores durante la fase de multiplicación y crecimiento *in vitro* y cuatro factores *ex vitro* durante la fase de aclimatación. La descripción de los factores y sus niveles se muestra en el cuadro 1.

Cada corrida se compuso por el promedio de cinco plantas distribuidas en forma de “X” en bandejas de polietileno para almácigo, de forma que cada planta se encontraba intercalada por un alveolo vacío (Figura 4). Cada unidad se introdujo en una minicámara húmeda con forma de prisma rectangular y 6210 cm<sup>3</sup> de volumen aproximadamente (15 cm de ancho, 23 cm de largo y 18 de alto). En cada minicámara se introdujo humedad mediante una aspersion con agua destilada, formándose una pequeña película de agua en la base de esta.

**Cuadro 1.** Factores y sus niveles a evaluar durante el crecimiento *in vitro* y durante la aclimatación de vitroplantas de yuca.

<b>Código</b>	<b>Factor</b>	<b>Tipo</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>
<b>Crecimiento <i>in vitro</i></b>				
E	Edad de crecimiento	Continuo	28 días	45 días
F	Concentración de Sacarosa	Continuo	2%	6%
G	Sección del explante	Categorico	Nudo	Ápice
<b>Aclimatación en ambiente controlado</b>				
A	Fotoperíodo	Continuo	8	16
B	Intensidad lumínica	Categorico	Baja	Alta
C	Tipo de auxina	Categorico*	AIA	AIB
D	Tratamiento al sustrato	Categorico	Agua destilada	Solución

Nota: \* Factor tipo categorico codificado.

Para los factores de tipo continuo, se manejaron tres niveles para estimar los efectos cuadráticos de los niveles (bajo, alto e intermedio), mientras que para las variables de tipo categorico se manejó dos niveles (bajo y alto). En el caso del tipo de auxina se planteó una codificación que le permite tener un nivel adicional siendo de tipo categorico (-1 = AIA (1000 ppm); 0 = Agua destilada; 1 = AIB (1000 ppm)). El nivel de intensidad de luz baja se estableció en 3400 lux (aproximadamente 85  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y la intensidad alta en 14 200 lux (aproximadamente 360  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). La solución empleada se compuso de un enraizante (Radigrow®; a una dosis de 2 mL.L<sup>-1</sup>), un bioestimulante (Nutrisorb® L; a una dosis de 2 ml/L<sup>-1</sup>) y un fungicida (Vitavax® - 300; a una dosis de 1 g/L<sup>-1</sup>).



**Figura 4.** Distribución de las plántulas en las bandejas para formar cada corrida.

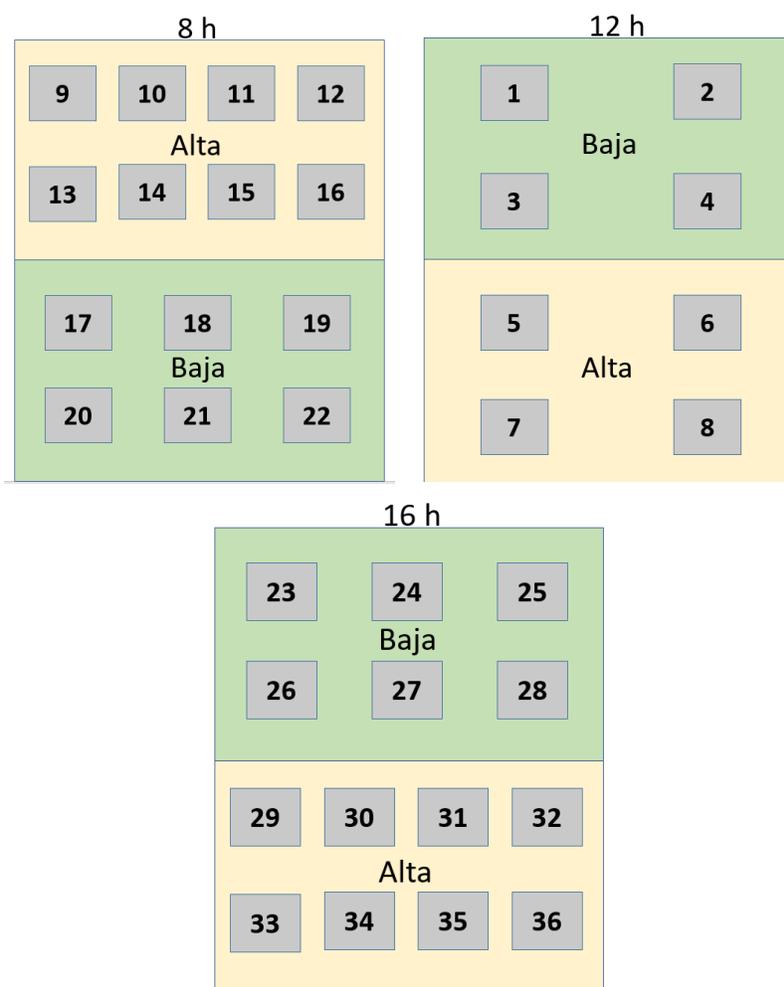
### **3.5 Variables de respuesta**

Se analizaron variables de crecimiento de la parte aérea y de la parte radical de las plántulas, así como la sobrevivencia de estas. Las variables de crecimiento de la parte aérea utilizadas fueron; 1) Longitud del tallo, 2) grosor del tallo, 3) área foliar, 4) número de nudos, 5) número de hojas y 6) peso fresco de la parte aérea. En cuanto a la parte radical, se cuantificó el 7) número de raíces, 8) la longitud de la raíz más larga y 9) peso fresco de las raíces.

### **3.6. Diseño experimental y arreglo de tratamientos**

El experimento se desarrolló siguiendo los pasos del proceso de experimentación secuencial, el cual tiene como objetivo la identificación de los factores más importantes e indagar sobre la configuración de factores que optimicen la respuesta de un sistema. Los pasos de este proceso son: 1) identificación del problema; 2) definición de la respuesta; 3) Elección de factores a estudiar; 4) encontrar la relevancia de los factores; 5) validación.

El diseño experimental que se utilizó fue un diseño de cribado definitivo para encontrar aquellos factores con mayor influencia en la aclimatación de las vitroplantas de yuca variedad Valencia. El diseño contó con siete factores y 18 corridas de base con réplica, lo que resultará en 36 corridas totales. A cada corrida se le asignó un nivel de cada factor de forma aleatoria (Cuadro 2). La distribución de las corridas se realizó en aleatoriamente en seis zonas según el resultado del diseño (Figura 5)



**Figura 5.** Distribución aleatorizada de las corridas dentro de las cámaras de ambiente controlado.

**Cuadro 2.** Diseño aleatorizado para la distribución de las corridas (- nivel alto, 0 punto medio, + nivel bajo).

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	Corrida	A	B	C	D	E	F	G
1	0	-	-	-	-	-	-	19	-	+	-	+	-	+	+
2	0	-	-	-	0	0	-	20	-	+	+	+	-	-	-
3	0	-	-	-	-	-	-	21	-	+	+	-	0	-	+
4	0	-	-	-	0	0	-	22	-	+	-	-	+	+	-
5	0	+	+	+	+	+	+	23	+	-	+	-	+	-	-
6	0	+	+	+	0	0	+	24	+	-	-	-	+	+	+
7	0	+	+	+	+	+	+	25	+	-	-	+	0	+	-
8	0	+	+	+	0	0	+	26	+	-	+	+	-	-	+
9	-	-	-	+	+	-	+	27	+	-	+	-	+	-	-
10	-	-	+	+	+	0	-	28	+	-	-	-	+	+	+
11	-	-	+	-	-	+	+	29	+	-	-	+	0	+	-
12	-	-	-	+	+	-	+	30	+	-	+	+	-	-	+
13	-	-	+	+	+	0	-	31	+	+	+	-	-	+	-
14	-	-	+	-	-	+	+	32	+	+	-	-	-	0	+
15	-	+	-	+	-	+	+	33	+	+	-	+	+	-	-
16	-	+	+	+	-	-	-	34	+	+	+	-	-	+	-
17	-	+	+	-	0	-	+	35	+	+	-	-	-	0	+
18	-	+	-	-	+	+	-	36	+	+	-	+	+	-	-

### 3.7 Recolección de datos del ambiente

Se llevó el registro de las condiciones ambientales dentro de la cámara de ambiente controlado durante todo período de estudio, guardando un registro cada minuto. A su vez, se muestreo la temperatura y la humedad relativa dentro de las microcámaras húmedas mediante dos tipos de sensores, termohigrómetro Pprotech TH2RP Serise dataloger y un sensor de temperatura y humedad desarrollado mediante la plataforma de creación electrónica de código abierta Arduino compatible con conexión remota y en tiempo real (uso auxiliar y didáctico).

### 3.8 Análisis estadístico

El análisis de los datos recopilados se realizó a través de las funciones de análisis para diseño de cribado disponibles en Minitab. Estas abarcan el análisis de varianza sobre la significancia de los factores y las gráficas de normalidad del efecto estandarizado y la gráfica de Pareto sobre los efectos estandarizados de los factores en estudio. Además, se llevó a cabo un análisis de optimización de respuesta para las variables con mayor significancia.

## 4. RESULTADOS

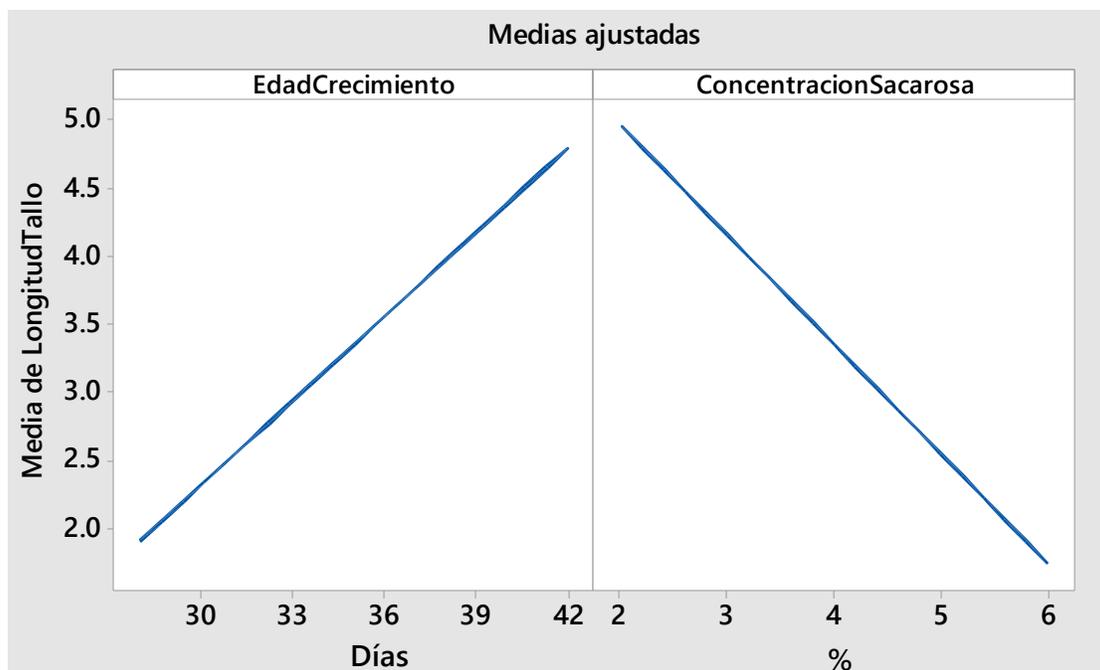
### 4.1. Crecimiento Aéreo

#### 4.1.1 Longitud del tallo

La longitud del tallo fue una de las variables respuestas con efectos más contrastantes observados durante el experimento. Las fuentes de variación de edad de crecimiento y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo fueron los factores estadísticamente significativos (Cuadro 3). El coeficiente de determinación encontrado por el modelo fue de 77,88%. En el caso del factor edad de crecimiento muestra un comportamiento creciente pasando en promedio de aproximadamente 2 cm a los 28 días después de la siembra (DDS) de edad hasta acercarse a la cifra de 5 cm a los 42 DDS. Por su parte, en el caso del factor concentración de sacarosa, los valores más altos en cuanto a la longitud del tallo se alcanzan con las concentraciones más bajas y se reduce drásticamente conforme se aumenta la concentración de sacarosa, como se observa en la figura 6-

**Cuadro 3.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable longitud de tallo ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	2	131.578	65.789	58.100	0.000
Lineal	2	131.578	65.789	58.100	0.000
Edad de Crecimiento	1	58.816	58.816	51.940	0.000
Concentración de Sacarosa	1	72.762	72.761	64.260	0.000
Error	33	37.368	1.1324		
Falta de ajuste	15	28.509	1.9006	3.860	0.004
Error puro	18	8.859	0.4922		
Total	35	168.947			



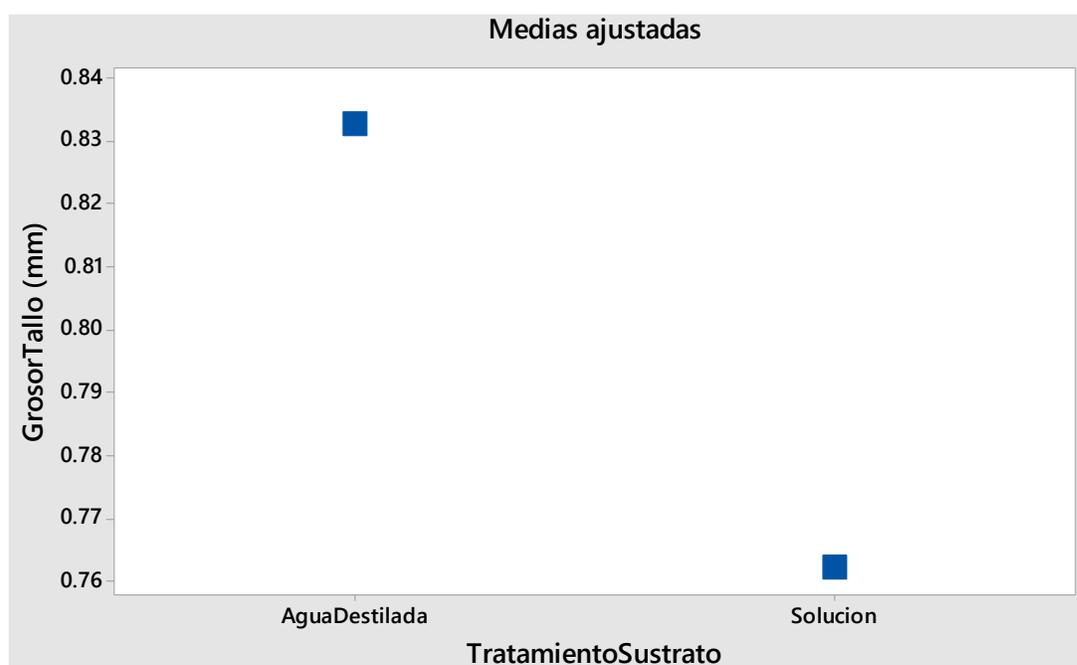
**Figura 6.** Medias ajustadas de la longitud del tallo de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores edad de crecimiento y el porcentaje de sacarosa en el medio de cultivo.

#### 4.1.2 Grosor del tallo

Para la variable de respuesta de grosor del tallo se registró un efecto estadísticamente significativo para el factor tratamiento de sustrato como efecto lineal (Cuadro 4). La variación en el grosor del tallo fue poco perceptible durante las evaluaciones y la influencia de los demás factores fue estadísticamente no significativa. El coeficiente de determinación para el modelo de esta variable fue de 11,32%. El efecto del factor tratamiento del sustrato se dio de tal manera que al emplear agua destilada se obtuvo un grosor del tallo mayor que al usar el nivel con solución (Figura 7).

**Cuadro 4.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable grosor de tallo ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	1	0.0446	0.0446	4.34	0.045
Lineal	1	0.0446	0.0446	4.34	0.045
Tratamiento al Sustrato	1	0.0446	0.0446	4.34	0.045
Error	34	0.3493	0.0103		
Falta de ajuste	16	0.1669	0.0104	1.03	0.472
Error puro	18	0.1823	0.0101		
Total	35	0.3938			



**Figura 7.** Medias ajustadas del grosor del tallo de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de del factor tratamiento al sustrato.

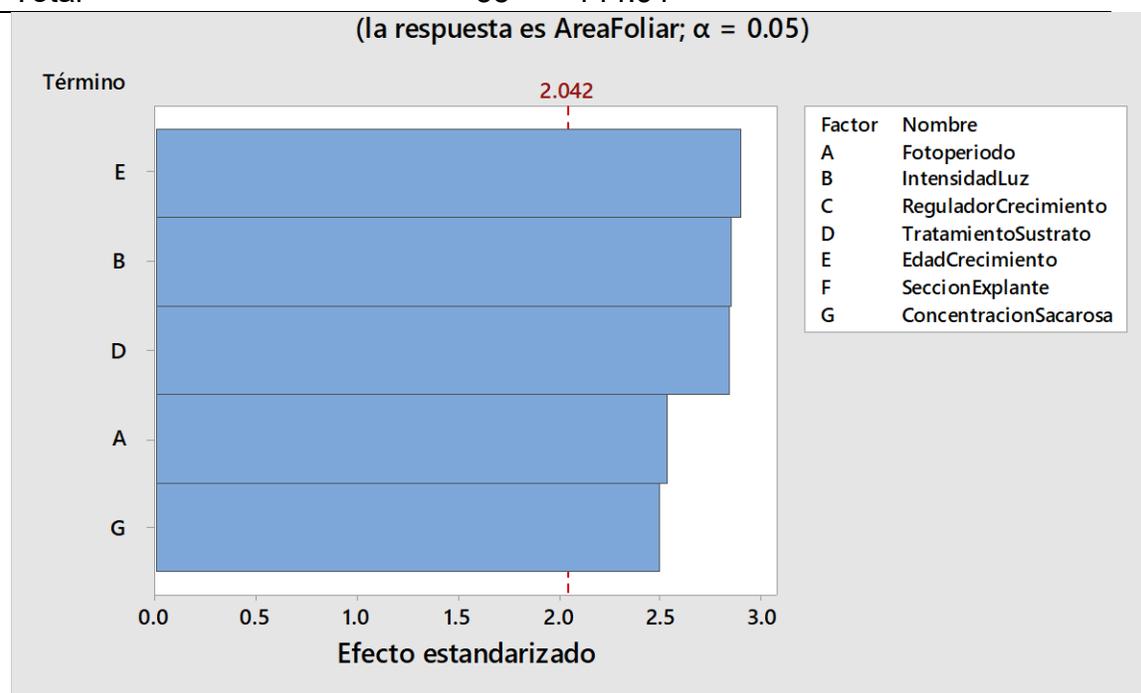
#### 4.1.3 Área foliar

Para la variable de área foliar los factores fotoperíodo, intensidad de luz, tratamiento al sustrato, edad de crecimiento y concentración de sacarosa mostraron efectos estadísticamente significativos para un modelo lineal (Cuadro 5). Los factores con efectos significativos mostraron una importancia similar en cuanto al

efecto sobre la variable área foliar (Figura 8). El ajuste de la ecuación del modelo presentó un coeficiente de determinación de 61,84%.

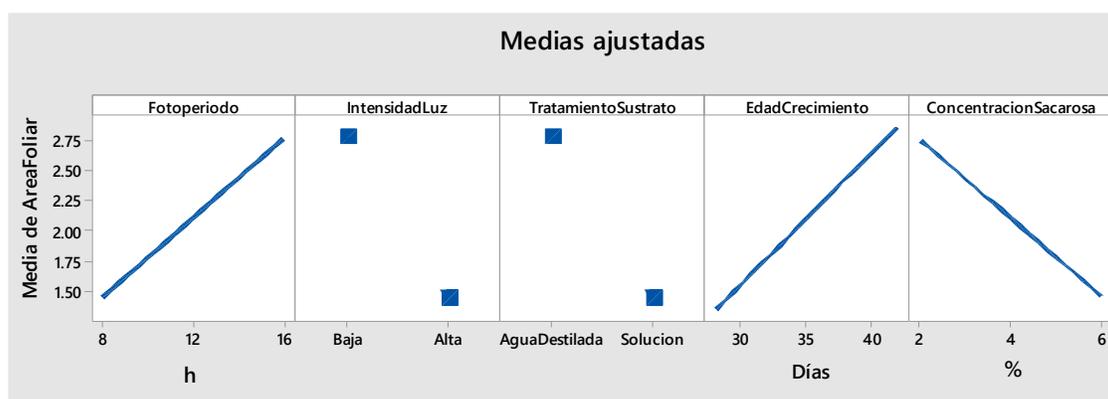
**Cuadro 5.** Análisis de varianza de los factores estadísticamente significativos para la variable área foliar ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	89.62	17.92	9.73	0.000
Lineal	5	89.62	17.92	9.73	0.000
Fotoperíodo	1	11.94	11.94	6.48	0.016
Intensidad de Luz	1	15.07	15.07	8.18	0.008
Tratamiento al Sustrato	1	14.93	14.92	8.10	0.008
Edad de Crecimiento	1	15.54	15.54	8.43	0.007
Concentración de Sacarosa	1	11.51	11.51	6.24	0.018
Error	30	55.29	1.84		
Falta de ajuste	12	39.51	3.29	3.76	0.006
Error puro	18	15.78	0.88		
Total	35	144.91			



**Figura 8.** Diagrama Pareto de efectos estandarizados de los factores estadísticamente significativos para la variable área foliar.

En la Figura 9 se muestra el efecto de los niveles para cada uno de los factores estadísticamente significativos para la variable área foliar. Para el factor fotoperíodo el área foliar incrementa linealmente conforme se aumenta el número de horas de luz por día, mientras que, en el caso de la intensidad de luz, el nivel de intensidad de luz baja muestra un mayor valor que cuando las vitroplantas son expuestas a una intensidad de luz alta. De igual forma, para el factor tratamiento de sustrato el nivel agua destilada alcanzó un valor medio más alto que el nivel solución. Para los factores edad de crecimiento y concentración de sacarosa los comportamientos obtenidos fueron lineales creciente para el primero y decreciente para el segundo respectivamente.



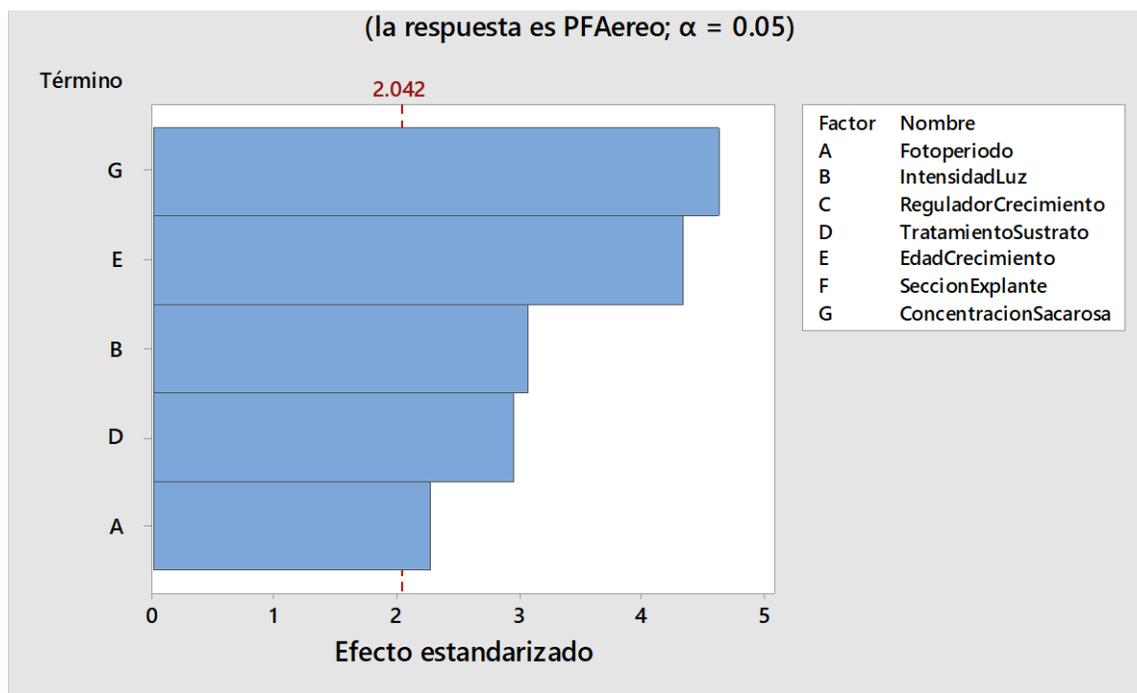
**Figura 9.** Efecto de los niveles de los factores estadísticamente significativos para la variable área foliar.

#### 4.1.4 Peso Fresco Aéreo

Para la variable de respuesta de peso fresco aéreo se encontraron diferencias significativas para los factores fotoperíodo, intensidad de luz, tratamiento de sustrato, edad de crecimiento y concentración de sacarosa (Cuadro 6). El coeficiente de determinación que se presentó para el modelo de esta variable fue de 72,69%. La concentración de sacarosa y la edad de crecimiento fueron los factores que mostraron una mayor influencia estandarizada sobre la respuesta para esta variable (Figura 10).

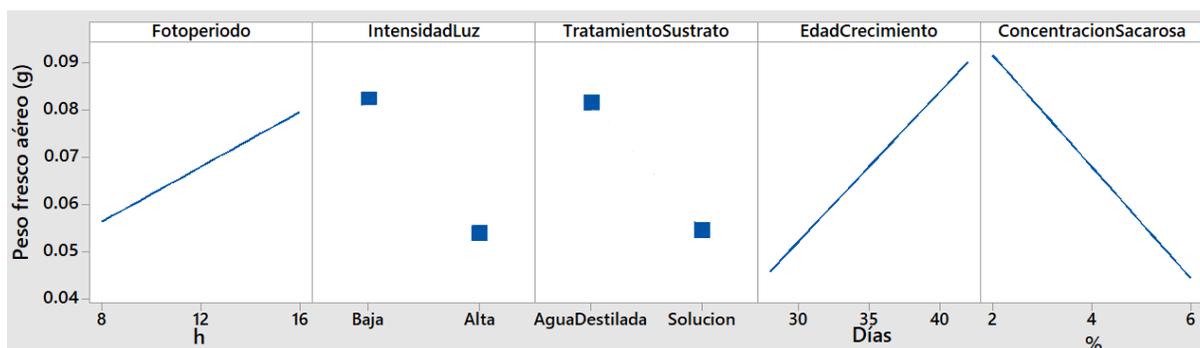
**Cuadro 6.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable peso fresco aéreo ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	0.0566	0.0113	15.97	0.000
Lineal	5	0.0566	0.0113	15.97	0.000
Fotoperíodo	1	0.0037	0.0037	5.18	0.030
Intensidad de Luz	1	0.0067	0.0067	9.52	0.004
Tratamiento al Sustrato	1	0.0062	0.0062	8.78	0.006
Edad de Crecimiento	1	0.0134	0.0134	18.91	0.000
Concentración de Sacarosa	1	0.0153	0.0153	21.53	0.000
Error	30	0.0213	0.0007		
Falta de ajuste	12	0.0151	0.0013	3.70	0.006
Error puro	18	0.0061	0.0003		
Total	35	0.0778			



**Figura 10.** Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta del peso fresco aéreo de plántulas *in vitro* de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.

En el gráfico factorial para los efectos principales para la variable peso fresco aéreo (Figura 11), se muestra el comportamiento para los factores según los niveles en estudio. Para el factor fotoperíodo se muestra un comportamiento lineal creciente conforme se aumentan las horas de luz por día. Para la variable de intensidad de luz se obtuvo un mayor peso fresco aéreo cuando la intensidad de luz era baja, que cuando esta se empleó en el nivel alto. De igual forma, en el caso del factor tratamiento de sustrato el nivel en el que se empleó agua destilada obtuvo un mayor peso fresco aéreo respecto al nivel en el que se utilizó la solución bioestimulante/fungicida. El factor edad de crecimiento mostró un comportamiento lineal creciente con una curva pronunciada, mientras que para el factor concentración de sacarosa el comportamiento fue linealmente decreciente.



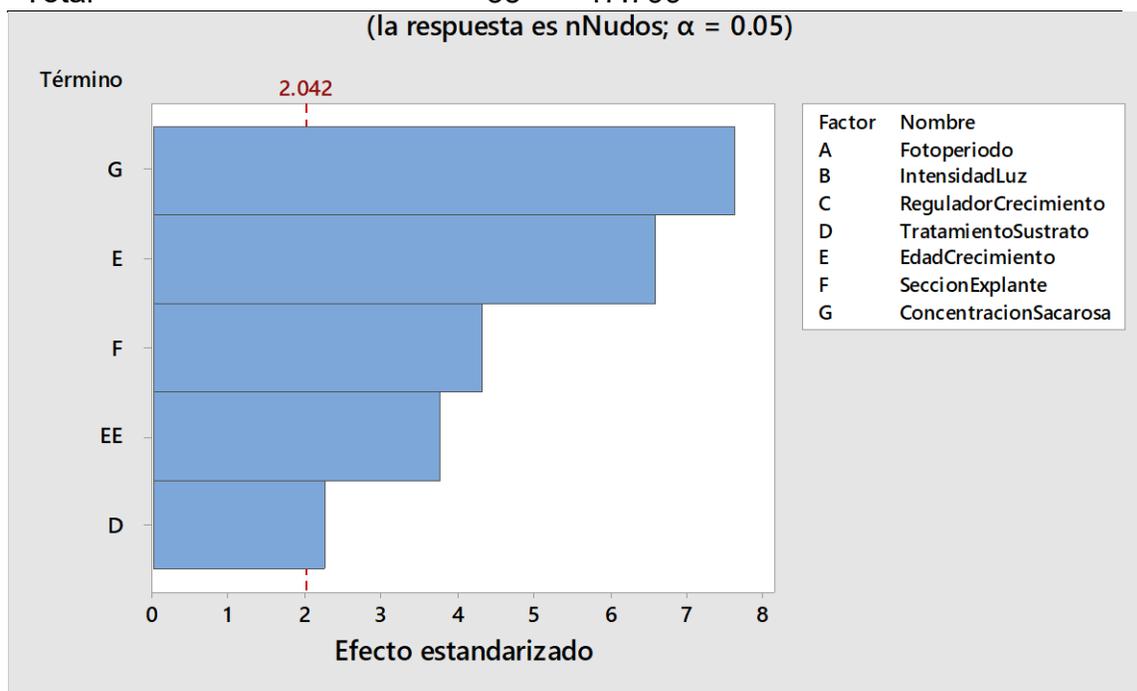
**Figura 11.** Medias ajustadas del peso fresco aéreo de plántulas de yuca de la variedad Valencia para los efectos de los factores fotoperíodo, intensidad de luz, tratamiento al sustrato, edad de crecimiento concentración de sacarosa.

#### 4.1.5 Número de Nudos

Para la variable número de nudos se presentaron diferencias significativas para los factores tratamiento de sustrato, edad de crecimiento, sección del explante y concentración de sacarosa como efectos lineales, así como, el efecto cuadrático de la edad de crecimiento (Cuadro 7). El coeficiente de determinación obtenido para el modelo fue de 84,13%. Los factores con mayor influencia sobre el número de nudos son los efectos de la concentración de sacarosa y la edad de crecimiento *in vitro* (Figura 12).

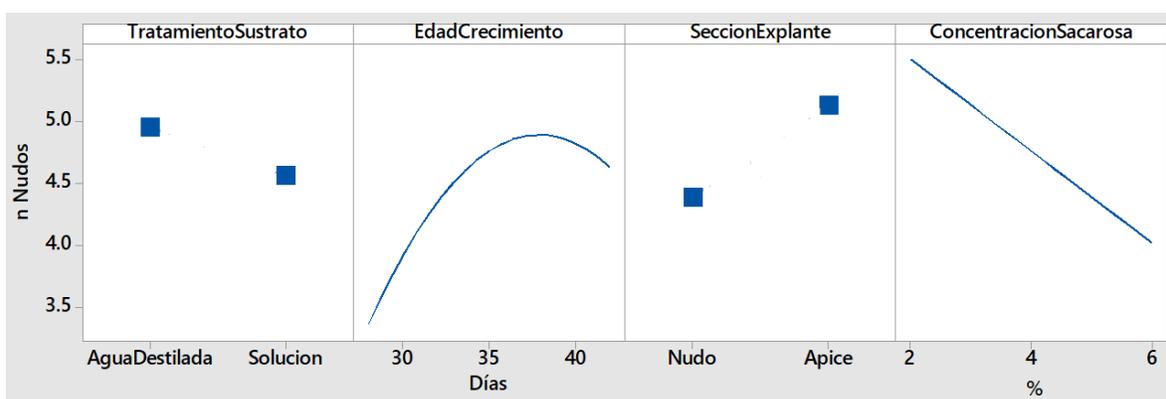
**Cuadro 7.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable número de nudos ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	40.212	8.0424	31.80	0.000
Lineal	4	36.594	9.1486	36.18	0.000
Tratamiento al Sustrato	1	1.297	1.2967	5.13	0.031
Edad de Crecimiento	1	11.003	11.0033	43.51	0.000
Sección del Explante	1	4.738	4.7376	18.73	0.000
Concentración de Sacarosa	1	14.741	14.7408	58.29	0.000
Cuadrado	1	3.618	3.6176	14.30	0.001
Edad de Crecimiento <sup>2</sup>	1	3.618	3.6176	14.30	0.001
Error	30	7.587	0.2529		
Falta de ajuste	12	3.282	0.2735	1.14	0.387
Error puro	18	4.305	0.2392		
Total	35	47.799			



**Figura 12.** Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta para el número de nudos de plántulas *in vitro* de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado

En la figura 13 se muestra el efecto de cada uno de los factores con significancia para la variable número de nudos. En ella se puede apreciar que para la variable número de nudos el valor obtenido es mayor cuando se usa agua destilada en comparación a el nivel solución, en cuanto al tratamiento del sustrato. La edad de crecimiento presenta un comportamiento cuadrático, obteniendo los valores más altos cuando la edad de crecimiento se maneja a 38 días de crecimiento *in vitro*. En cuanto a la sección del explante, se obtienen valores más altos de número de nudos cuando se emplean ápices respecto a cuando se emplean nudos. Finalmente, el efecto de la concentración de sacarosa es decreciente de forma lineal.



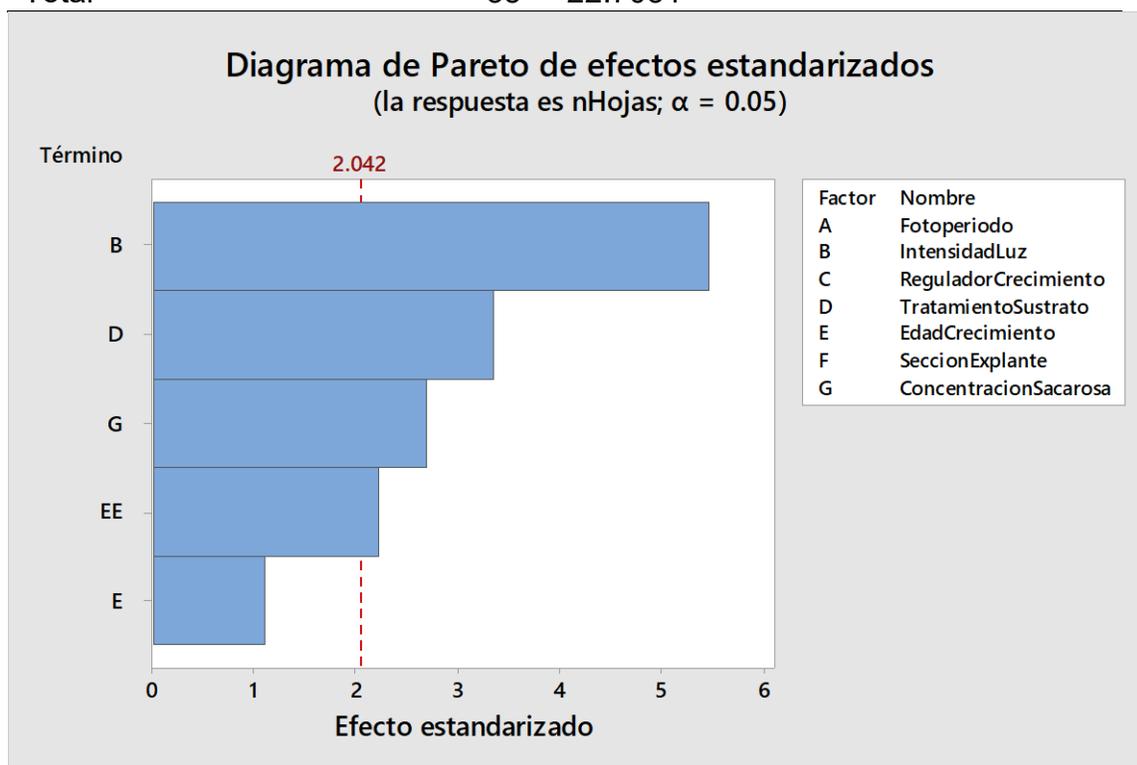
**Figura 13.** Medias ajustadas para el número de nudos de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores tratamiento al sustrato, edad de crecimiento, sección del explante concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

#### 4.1.6 Número de hojas

Para la variable número de hojas se encontraron diferencias significativas para los factores intensidad de luz, tratamiento de sustrato, concentración de sacarosa y el efecto cuadrático de la edad de crecimiento (Cuadro 8). El factor intensidad de luz mostró el mayor efecto sobre el número de hojas de las plántulas, seguido por el tratamiento del sustrato, la concentración de sacarosa y en última instancia el efecto del cuadrado del factor edad de crecimiento (Figura 14).

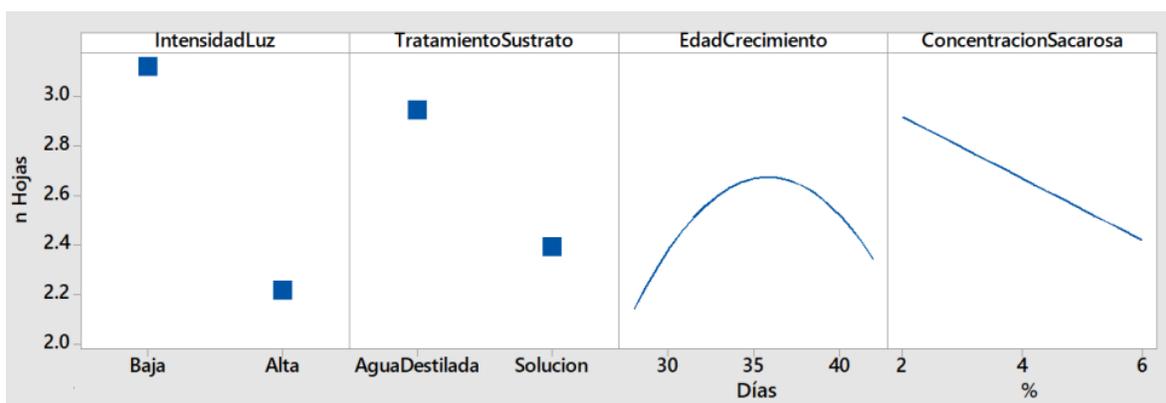
**Cuadro 8.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable número de hojas ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	15.7458	3.1492	13.58	0.000
Lineal	4	14.6077	3.6519	15.75	0.000
Intensidad de Luz	1	6.9641	6.9641	30.03	0.000
Tratamiento al Sustrato	1	2.6092	2.6092	11.25	0.002
Edad de Crecimiento	1	0.2801	0.2801	1.21	0.281
Concentración de Sacarosa	1	1.6751	1.6751	7.22	0.012
Cuadrado	1	1.1381	1.1381	4.91	0.034
Edad de Crecimiento <sup>2</sup>	1	1.1381	1.1381	4.91	0.034
Error	30	6.9573	0.2319		
Falta de ajuste	12	4.6923	0.3910	3.11	0.015
Error puro	18	2.2650	0.1258		
Total	35	22.7031			



**Figura 14.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta para el número de hojas de plántulas *in vitro* de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.

La respuesta en cuanto al factor intensidad de luz para el número de hojas fue significativamente mayor cuando la intensidad de luz fue baja en la que en promedio se obtuvo cerca de una hoja más en comparación con la respuesta ante el nivel de intensidad de luz alta. El tratamiento de sustrato con agua destilada presentó un mayor número de hojas que el tratamiento al sustrato con solución. El efecto de la edad de crecimiento presentó un comportamiento cuadrático sobre el número de hojas. En relación con la concentración de sacarosa, el efecto sobre esta variable se percibió de forma linealmente decreciente sobre esta variable (Figura 15).



**Figura 15.** Medias ajustadas del número de hojas de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores intensidad de luz, tratamiento al sustrato, edad de crecimiento y concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

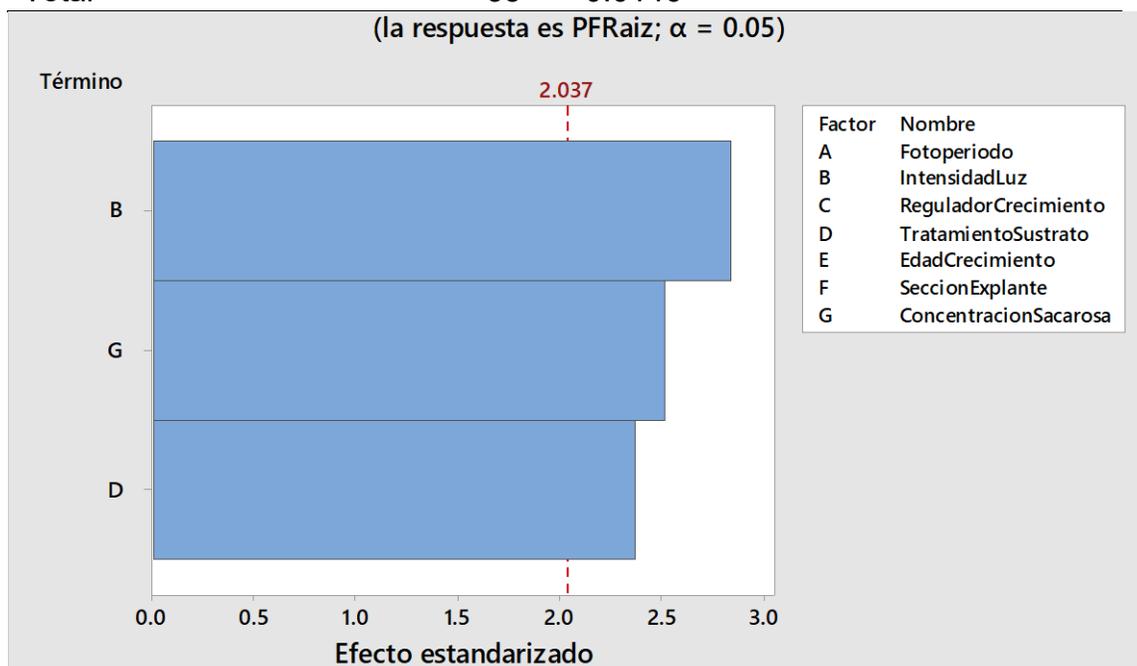
## 4.2. Crecimiento radical

### 4.2.1 Peso fresco raíz

Para la variable de peso fresco de raíz se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los factores intensidad de luz, tratamiento de sustrato y concentración de sacarosa (Cuadro 9). De los factores significativos el que mayor efecto tiene sobre el peso fresco radicular es la intensidad de luz, aunque la variación entre el efecto de los tres factores es similar (Figura 16). El coeficiente de determinación para el modelo encontrado para esta variable es de 44.41%.

**Cuadro 9.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable peso fresco de la raíz ( $\alpha = 0,05$ ).

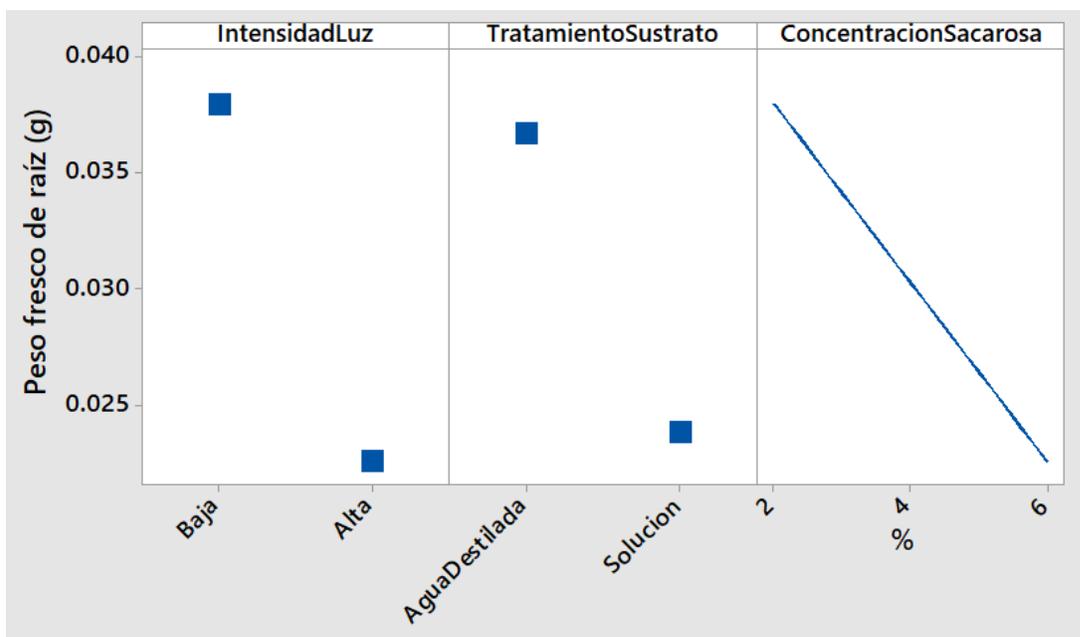
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0.0065	0.0022	8.52	0.000
Lineal	3	0.0065	0.0022	8.52	0.000
Intensidad de Luz	1	0.0021	0.0021	8.08	0.008
Tratamiento al Sustrato	1	0.0014	0.0014	5.65	0.024
Concentración de Sacarosa	1	0.0016	0.0016	6.34	0.017
Error	32	0.0081	0.0003		
Falta de ajuste	14	0.0045	0.0003	1.57	0.183
Error puro	18	0.0037	0.0002		
Total	35	0.0146			



**Figura 16.** Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta del peso fresco aéreo de plántulas *in vitro* de yuca variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.

El efecto del factor intensidad de luz presentó peso fresco de raíz cuando el nivel empleado de intensidad de luz baja. En el caso del tratamiento del sustrato los valores más altos para esta variable se presentaron cuando se utilizó agua destilada en comparación que cuando se utilizó solución. En cuanto a el efecto del

factor concentración de sacarosa la tendencia de su comportamiento fue linealmente decreciente (Figura 17).



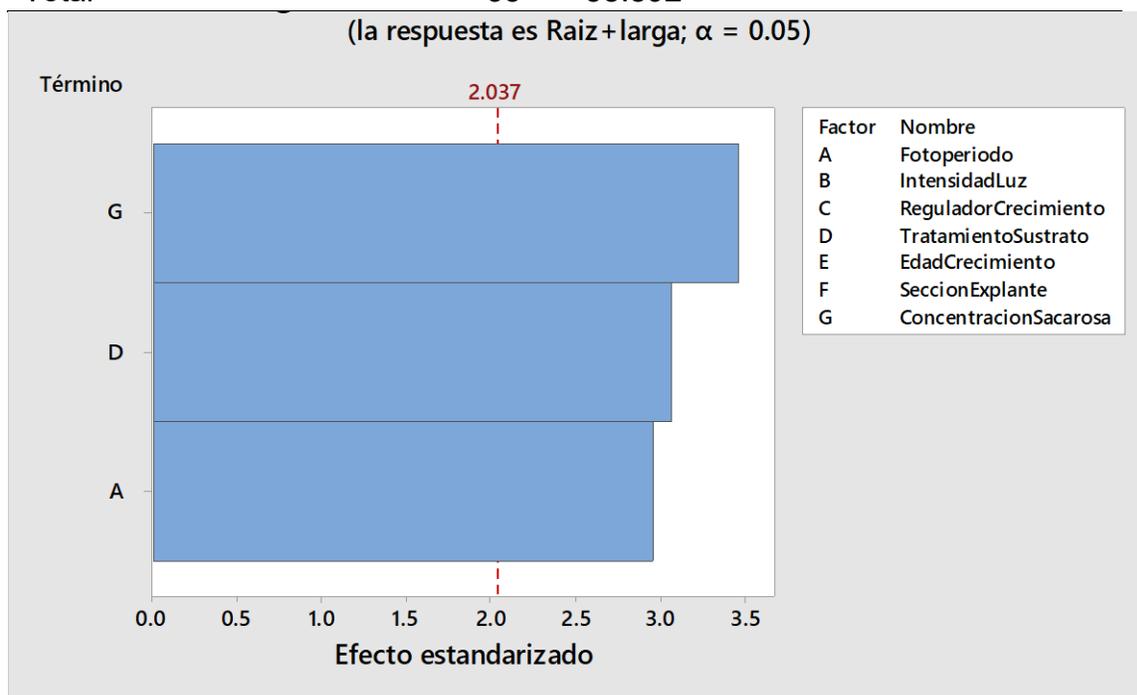
**Figura 17.** Medias ajustadas del peso fresco radical de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores intensidad de luz, tratamiento al sustrato y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

#### 4.2.2 Longitud de la raíz más larga

En el caso de la variable de respuesta longitud de la raíz más larga hubo efecto con diferencias estadísticamente significativas en tres factores (Cuadro 10). Los factores con efectos significativos fueron la concentración de sacarosa, el tratamiento del sustrato y el fotoperíodo, en ese orden de mayor a menor efecto sobre esta variable (Figura 18). El coeficiente de determinación descrito por el modelo fue de 52,94%.

**Cuadro 10.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable longitud de la raíz más larga ( $\alpha = 0,05$ ).

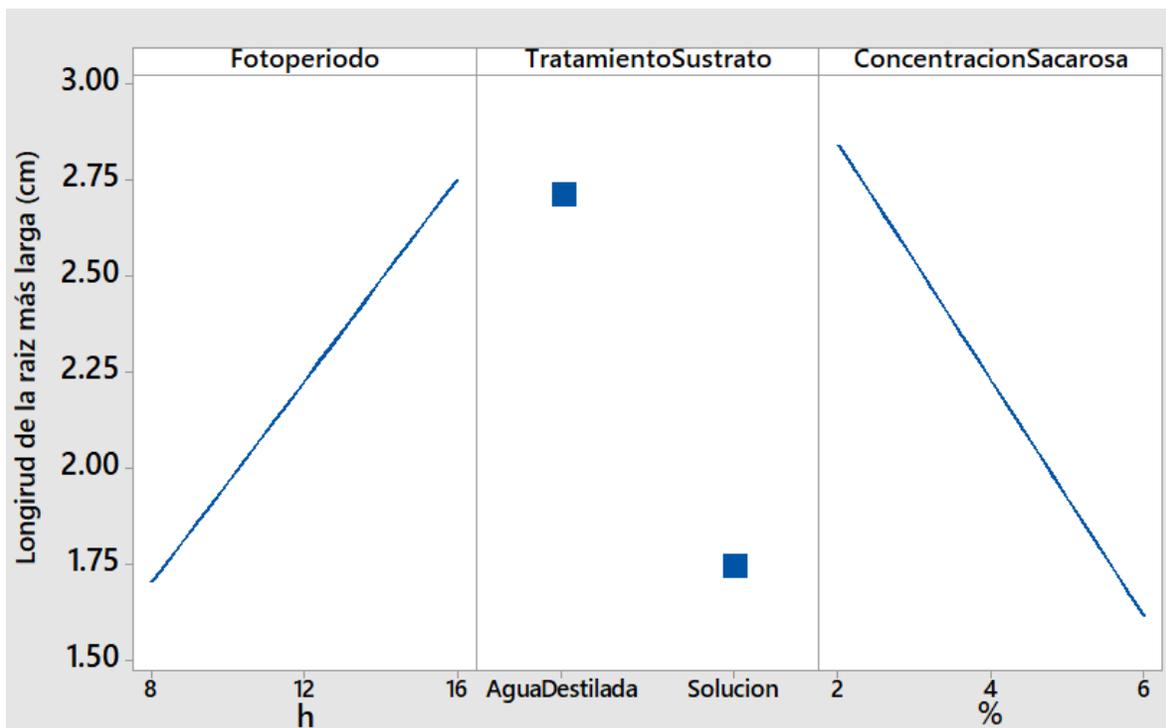
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	31.175	10.391	12.00	0.000
Lineal	3	31.175	10.391	12.00	0.000
Fotoperíodo	1	7.597	7.596	8.77	0.006
Tratamiento al Sustrato	1	8.180	8.179	9.44	0.004
Concentración de Sacarosa	1	10.417	10.417	12.03	0.002
Error	32	27.717	0.866		
Falta de ajuste	14	19.683	1.405	3.15	0.012
Error puro	18	8.034	0.4463		
Total	35	58.892			



**Figura 18.** Diagrama Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta de la raíz más larga de plántulas *in vitro* de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.

En la Figura 19 se observa el efecto de los factores según los niveles de cada uno de estos. Para el factor fotoperíodo se presentó un comportamiento lineal creciente al aumentar las horas de luz por día. En el caso del tratamiento del sustrato, el crecimiento de las raíces fue mayor cuando se empleó agua destilada

en comparación que cuando se utilizó el tratamiento con solución. En cuanto al efecto del factor concentración de sacarosa su comportamiento se dio de forma lineal decreciente al aumentar la concentración en el medio durante el crecimiento *in vitro*.



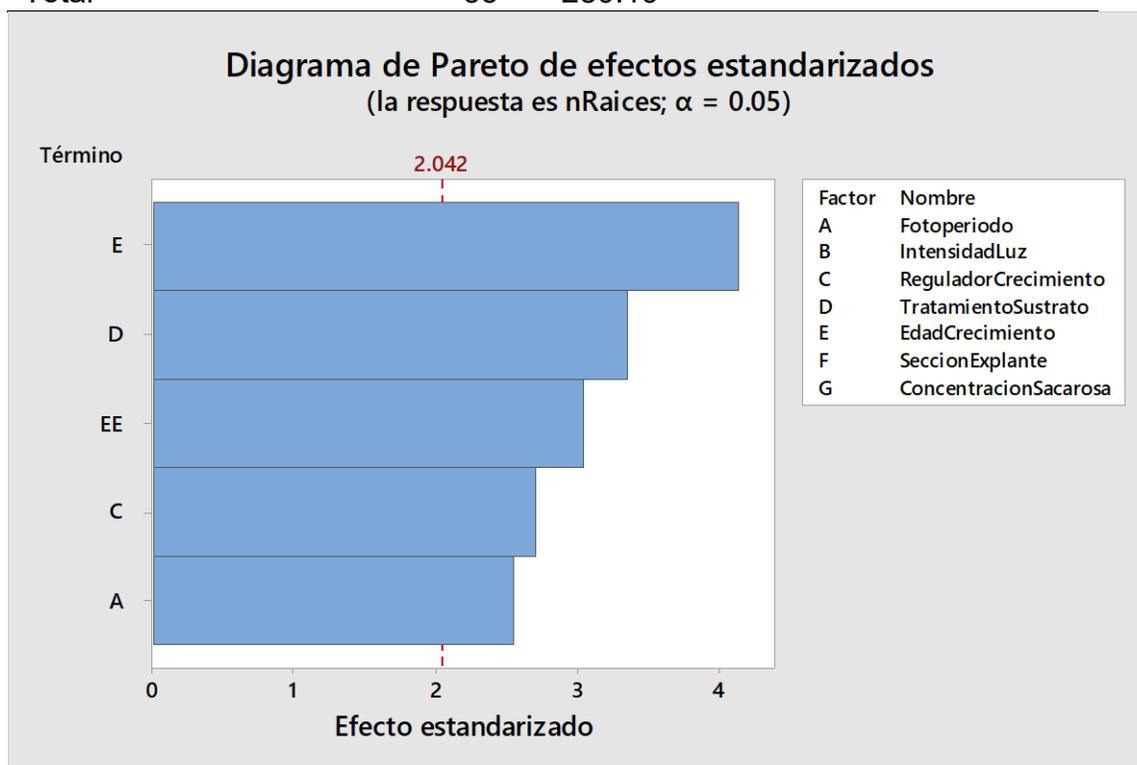
**Figura 19.** Medias ajustadas de la longitud de la raíz más larga de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores fotoperíodo, tratamiento al sustrato y concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

#### 4.2.3 Número de Raíces

Para la variable número de raíces se presentaron diferencias significativas en cuanto a los factores fotoperíodo, regulador de crecimiento, tratamiento de sustrato y edad de crecimiento como efectos lineales y el efecto cuadrático de la edad de crecimiento (Cuadro 11). El coeficiente de determinación para el modelo fue de 64,14%. El factor que mostró mayor efecto sobre la variación del número de raíces fue la edad de crecimiento, en segundo lugar, en cuanto efecto se encontró la variación en el factor tratamiento de sustrato (Figura 20).

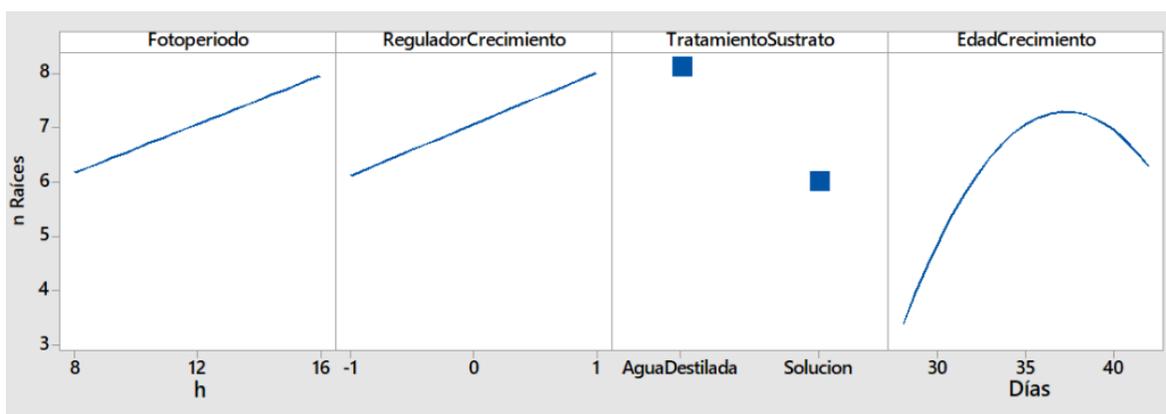
**Cuadro 11.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable número de raíces ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	179.71	35.943	10.73	0.000
Lineal	4	148.66	37.166	11.10	0.000
Fotoperíodo	1	21.97	21.970	6.56	0.016
Regulador de Crecimiento	1	24.62	24.623	7.35	0.011
Tratamiento al Sustrato	1	37.65	37.650	11.24	0.002
Edad de Crecimiento	1	57.50	57.502	17.17	0.000
Cuadrado	1	31.05	31.052	9.27	0.005
Edad de Crecimiento <sup>2</sup>	1	31.05	31.052	9.27	0.005
Error	30	100.47	3.349		
Falta de ajuste	12	66.06	5.505	2.88	0.021
Error puro	18	34.41	1.911		
Total	35	280.19			



**Figura 20.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la respuesta para el número raíces de plántulas *in vitro* de yuca de la variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.

El efecto del fotoperíodo fue linealmente creciente en relación con el aumento en la cantidad de horas luz diaria. En el caso del regulador de crecimiento, el mayor número de raíces se consiguió utilizando el regulador de crecimiento AIB, mientras que el regulador de crecimiento AIA presentó un valor inferior incluso que el nivel al que no se le aplicó regulador de crecimiento. Para el efecto del factor tratamiento de sustrato, nuevamente, los valores más altos se obtuvieron al emplear agua destilada a este. En cuanto a la edad de crecimiento, el comportamiento de su efecto fue cuadrático (Figura 21).



**Figura 21.** Medias ajustadas para el número de raíces en plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de los factores fotoperíodo, regulador de crecimiento, tratamiento al sustrato y edad de crecimiento.

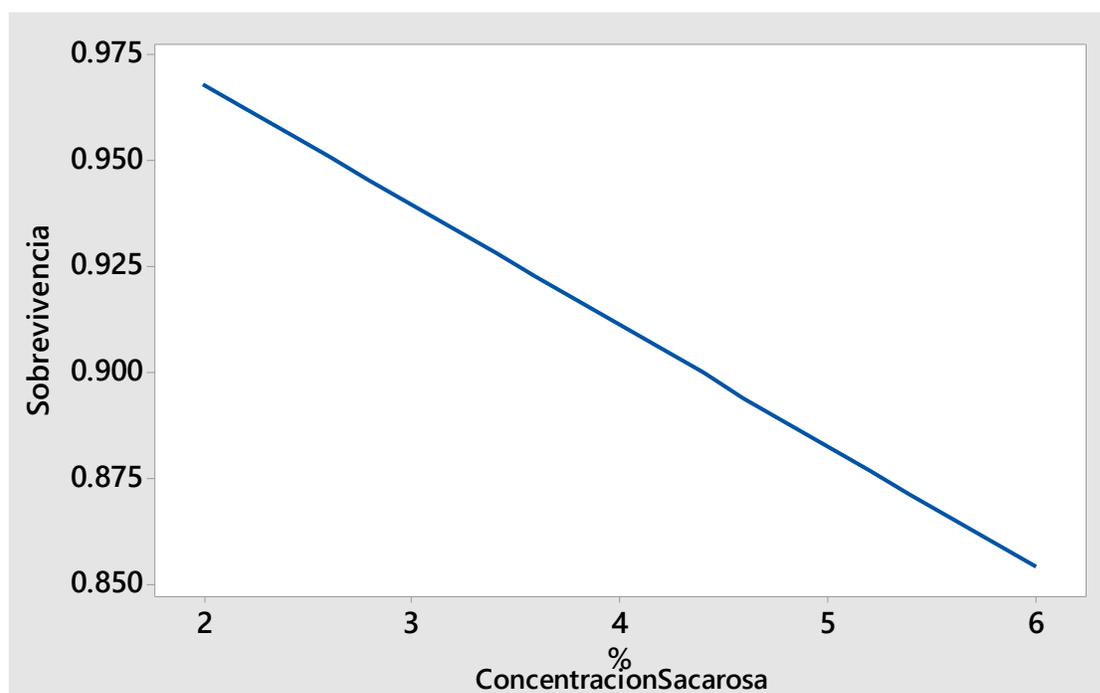
### 4.3 Otras variables

#### 4.3.1 Sobrevivencia

La sobrevivencia de las vitroplantas de yuca variedad Valencia presentó efecto estadísticamente significativo para el factor sacarosa (Cuadro 12). El coeficiente de determinación descrito por el modelo fue de 13,53%. El incremento en la concentración de sacarosa mostró un efecto perjudicial en cuanto a la sobrevivencia de las plántulas de yuca al proceso de aclimatación (Figura 22).

**Cuadro 12.** Análisis de varianza de los factores principales para la variable sobrevivencia ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	1	0.09143	0.09143	5.32	0.027
Lineal	1	0.09143	0.09143	5.32	0.027
Concentración de Sacarosa	1	0.09143	0.09143	5.32	0.027
Error	34	0.58413	0.01718		
Falta de ajuste	16	0.26413	0.01651	0.93	0.556
Error puro	18	0.32000	0.01778		
Total	35	0.67556			



**Figura 22.** Medias ajustadas para la sobrevivencia de plántulas de yuca variedad Valencia para los efectos de la concentración de sacarosa.

### 4.3.2 Optimización de los factores

Para la optimización de los niveles de los factores propuestos se descartó como factor la sección del explante dado que sólo presentó un leve efecto sobre el número de nudos de las plántulas. De igual forma, la respuesta de número de nudos, así como el grosor del tallo, fueron descartados en esta etapa, dado a que se consideraron como respuesta ante los factores. En el caso de la longitud del tallo de las plántulas, pese a ser una de las respuestas que presentó mayor efecto en su respuesta, no se consideró como una variable determinante al momento del desempeño de las plántulas (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Parámetros de optimización para las variables peso fresco de raíz, peso fresco aéreo, área foliar, número de hojas, número de raíces y sobrevivencia para plántulas de yuca variedad Valencia aclimatadas bajo condiciones de ambiente controlado.

<b>Respuesta</b>	<b>Meta</b>	<b>Inferior</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Ponderación</b>	<b>Importancia</b>
<b>PF Raíz</b>	Máximo	0.00200	0.082	1	1
<b>PF Aéreo</b>	Máximo	0.01000	0.186	1	1
<b>Área Foliar</b>	Máximo	0.13200	9.808	1	1
<b>N Hojas</b>	Máximo	1.00000	4.200	1	1
<b>N Raíces</b>	Máximo	1.25000	12.200	1	1
<b>Sobrevivencia</b>	Máximo	0.60000	1.000	1	1

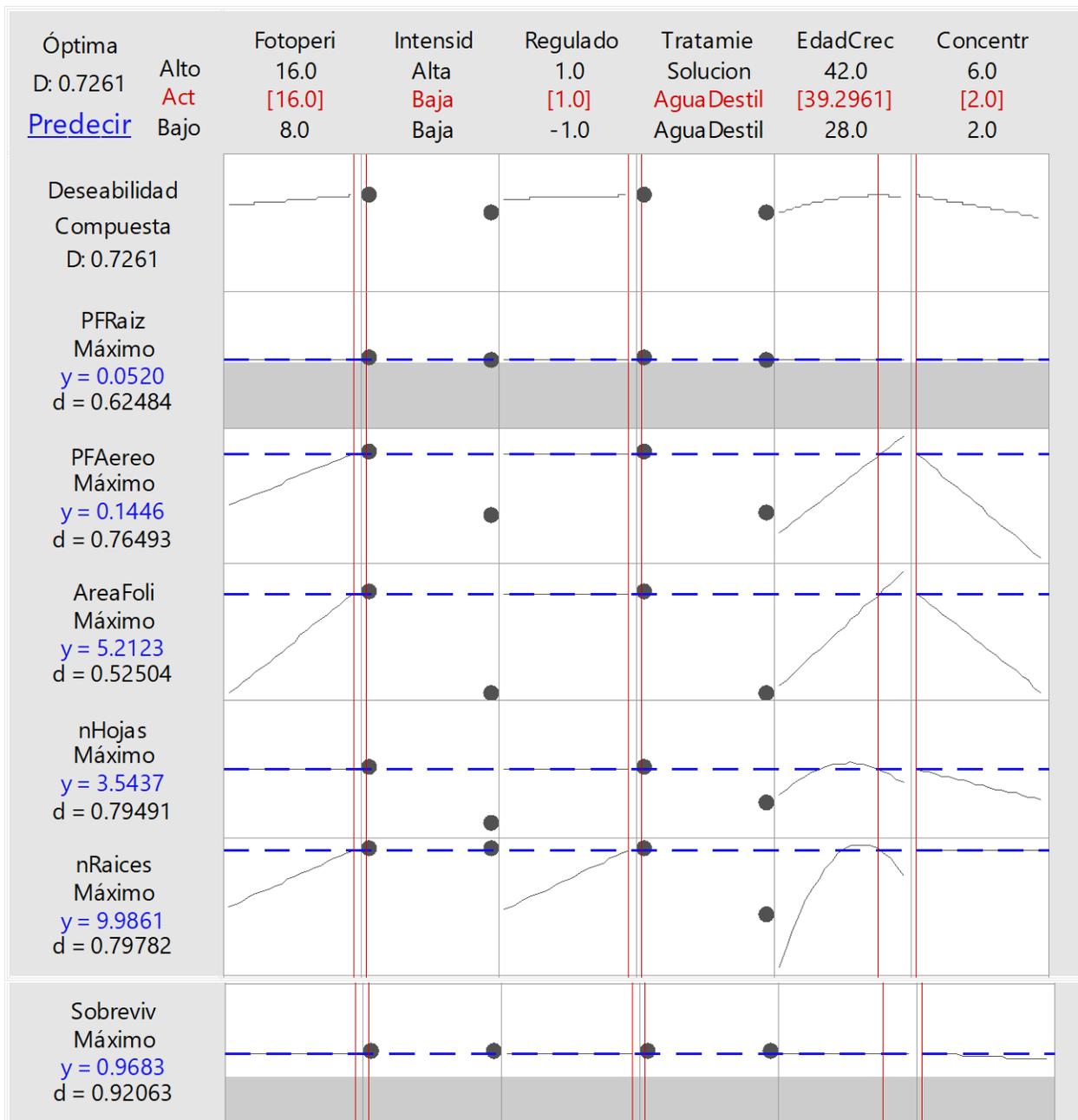
Los valores óptimos obtenidos en el análisis de optimización se muestran en el Cuadro 14. El comportamiento de las variables analizadas con interacción de los factores en los niveles óptimos y la respuesta en conjunto e individualmente de cada una de las variables de respuesta se presenta en la Figura 23.

**Cuadro 14.** Solución para los parámetros de optimización para los factores en estudio.

<b>Variable</b>	<b>Valor de configuración</b>			
<b>Fotoperíodo</b>	16			
<b>Intensidad de Luz</b>	Baja			
<b>Regulador de Crecimiento</b>	1 (AIB)			
<b>Tratamiento al Sustrato</b>	Agua Destilada			
<b>Edad de Crecimiento</b>	39.2961			
<b>Concentración de Sacarosa</b>	2			

<b>Respuesta</b>	<b>Ajuste</b>	<b>EE de ajuste</b>	<b>IC de 95%</b>	<b>IP de 95%</b>
<b>PF Raíz (g)</b>	0.051	0.005	(0.042; 0.062)	(0.018; 0.086)
<b>PF Aéreo (g)</b>	0.144	0.001	(0.124; 0.165)	(0.087; 0.203)
<b>Área Foliar (cm<sup>2</sup>)</b>	5.212	0.508	(4.174; 6.251)	(2.252; 8.173)
<b>N Hojas</b>	3.544	0.181	(3.174; 3.913)	(2.493; 4.594)
<b>N Raíces</b>	9.986	0.726	(8.504; 11.468)	(5.966; 14.007)
<b>Sobrevivencia</b>	0.9683	0.0330	(0.9011; 1.0354)	(0.6936; 1.2430)



**Figura 23.** Gráfica de optimización para la aclimatación de plantas *in vitro* de yuca variedad Valencia bajo condiciones de ambiente controlado.

### 4.3.3 Condiciones ambientales

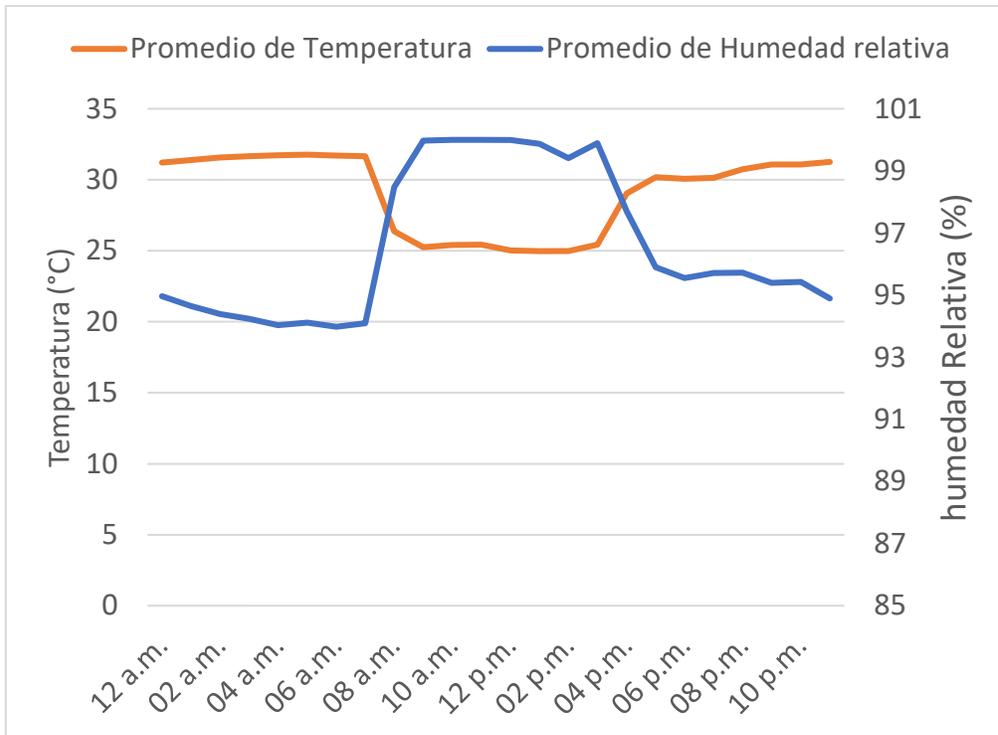
El registro de las condiciones de la cámara general muestra un comportamiento relativamente constante a lo largo del tiempo de estudio. Las variaciones en la temperatura durante este período fueron de 1,6 °C entre la máxima

la mínima temperatura registrada. En cuanto a la humedad relativa, la variación fue mayor presentándose 36% de diferencia entre la máxima y la mínima humedad relativa registrada. El resumen del comportamiento del ambiente en la cámara de ambiente controlado se muestra en el cuadro 15.

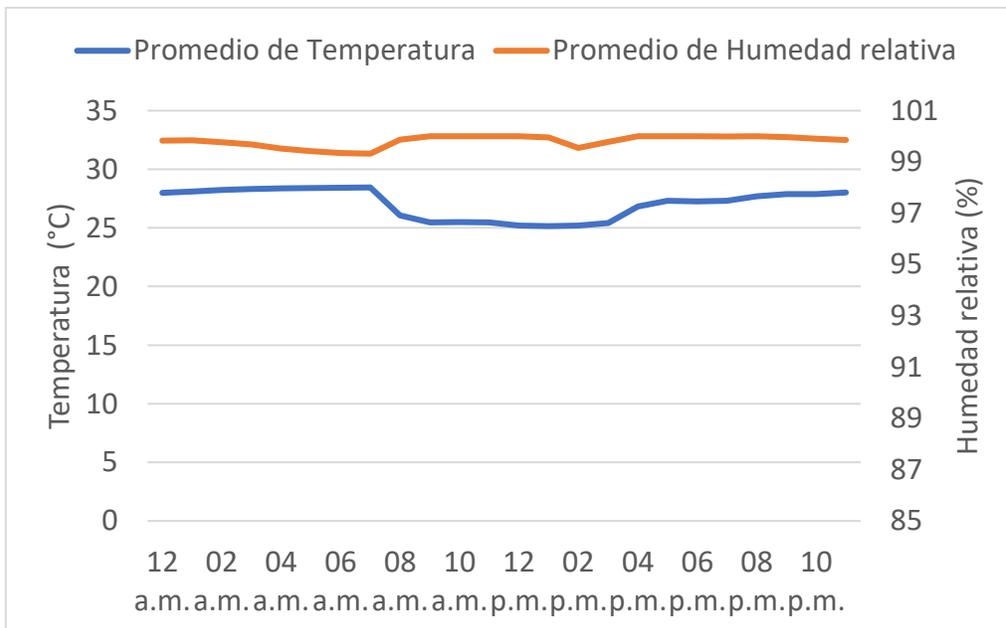
El comportamiento de la temperatura y la humedad relativa dentro de las minicámaras húmedas registrado para cada una de las zonas tuvo una estrecha relación con la intensidad de luz y el fotoperiodo suministrado. En todas las zonas se presentó un crecimiento acelerado dentro de las primeras dos horas de la temperatura con un descenso inversamente proporcional en cuanto a la humedad relativa. Las mayores temperaturas se alcanzaron en las zonas con intensidad de luz alta, alcanzando valores máximos cercanos a las 32 °C (Figura 24 y Figura 26). Por su parte, en las zonas con intensidad de luz baja la temperatura alcanzó alrededor de 28 °C como valores máximos (Figura 25 y Figura 27). En todas las zonas la temperatura mínima rondó los 25 °C.

**Cuadro 15.** Resumen de la temperatura y Humedad relativa registrada con los sensores de la cámara

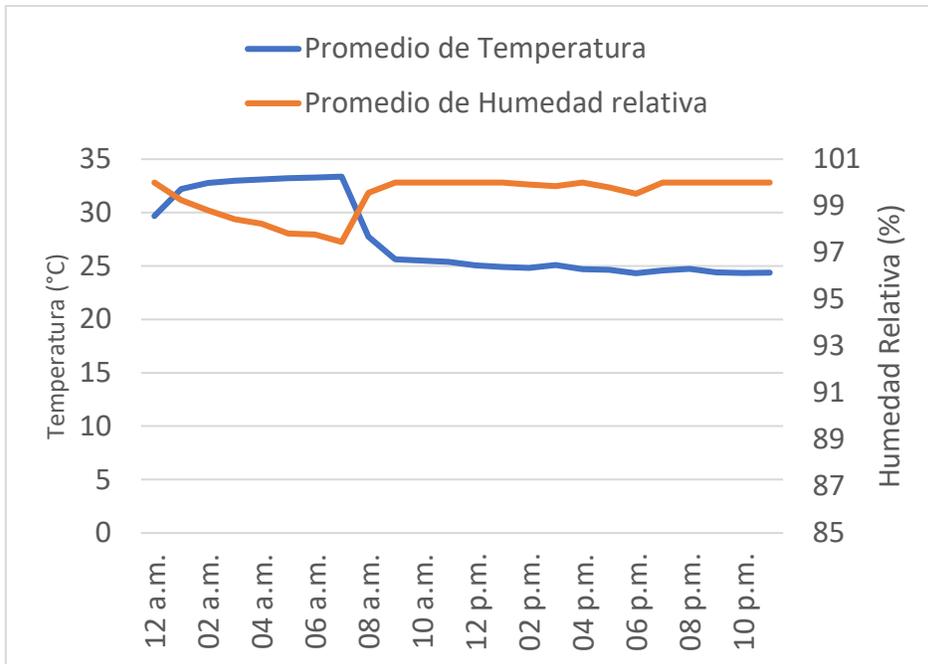
	Temperatura (°C)	Humedad relativa
<b>Máximo</b>	26,1	99%
<b>Mínimo</b>	24,5	63%
<b>Promedio</b>	25,6	82%
<b>%CV</b>	02,7%	8,5%



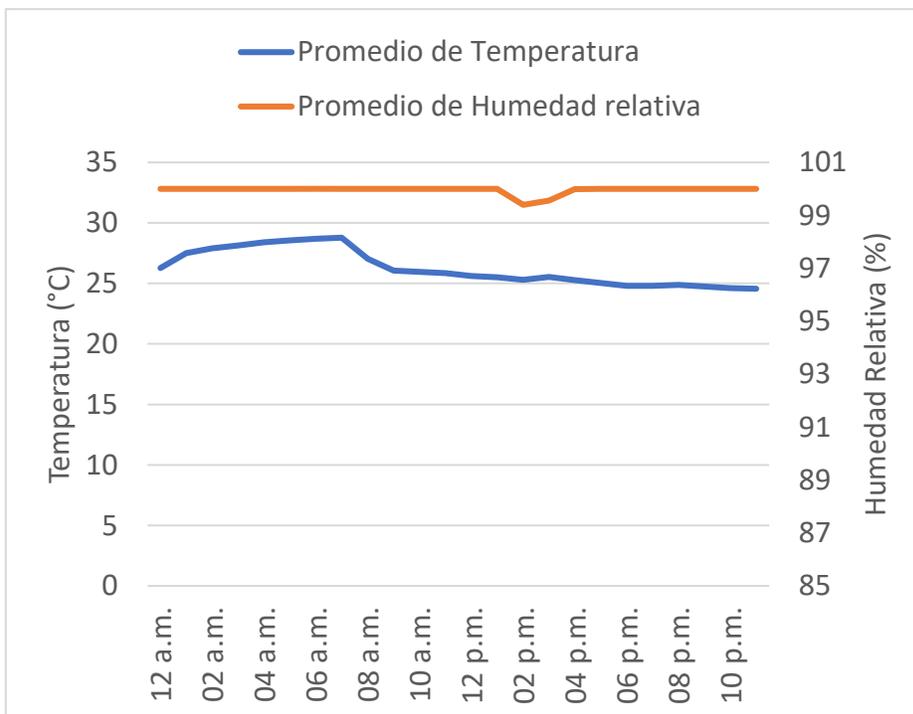
**Figura 24.** Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en las corridas con intensidad de luz alta y fotoperíodo de 16 h de luz.



**Figura 25.** Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en la zana con intensidad de luz baja y fotoperíodo de 16 h de luz.



**Figura 26.** Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en la zona con intensidad de luz alta y fotoperíodo de 8 h de luz.



**Figura 27.** Temperatura media y humedad relativa media dentro de las minicámaras húmedas ubicadas en la zona con intensidad de luz baja y fotoperíodo de 8 h de luz.

#### **4.4 Propuesta del protocolo de aclimatación**

A partir de los datos obtenidos en esa investigación se propone el siguiente protocolo, el cual describirá los aspectos relacionados a la etapa de transferencia de las plantas de condiciones *in vitro* de laboratorio a condiciones *ex vitro* bajo condiciones de ambiente controlado. Para que el proceso se lleve a cabo de forma eficiente, es necesario haber realizado las labores preoperacionales, que incluyen el entrenamiento del personal, preparación de las instalaciones y equipo necesario durante el proceso. Es necesario contar con un material vegetal previamente introducido a condiciones de crecimiento *in vitro* aséptico y que se encuentre fisiológicamente preparado para ser sometido a un proceso de multiplicación.

El principio fundamental dentro del proceso de transferencia al ambiente *ex vitro* para las plántulas de yuca variedad Valencia se basa en aclimatación gradual, de forma que las plántulas no sean sometidas a cambios abruptos en las condiciones de su ambiente abiótico y biótico. El objetivo durante este proceso debe ser propiciar las condiciones físicas, químicas y bióticas para que se lleven a cabo los reajustes anatómicos y fisiológicos necesarios en las plántulas para que puedan desarrollarse de forma habitual en el campo.

##### **A) Material vegetal y crecimiento *in vitro***

Los explantes de un centímetro de longitud deben ser cultivados en un medio de cultivo Murashige y Skoog base (Medio MS), con suplementación de sacarosa entre 20 g.L<sup>-1</sup> a 30 g.L<sup>-1</sup>.

Se deben mantener los explantes en cuarto de crecimiento durante 35 días a 40 días, con una intensidad de luz entre 2500 y 3000 lux para lámparas fluorescentes 5700 K o a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos entre 32 a 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^2$ .

##### **B) Transferencia al ambiente *ex vitro***

Una vez que se finaliza el proceso de crecimiento *in vitro* se transporta el material a la zona en la que van a ser transferidos. Es necesario que las cámaras donde se van a mantener se encuentren limpias y desinfectadas.

Para retirar el sello hermético y las tapas es necesario que las condiciones ambientales sean de sombra y que se cuente con una humedad alta en el lugar. Además, se debe contar con aspersores para rociar las plantas para evitar la pérdida súbita de agua y el marchitamiento de estas.

Se realiza la separación de las plántulas del medio de cultivo cuidadosamente para reducir los daños mecánicos y se lava la base para retirar cualquier residuo de medio de cultivo.

### **C) Siembra de las plántulas**

Una vez libre de medio de cultivo se poda las raíces de las plántulas, cortando en la base de las raíces y sumergir la base de las plántulas en una solución de ácido indole butírico a una concentración de 1000 ppm.

Posteriormente se introduce con la ayuda de una pinza se introduce alrededor de un centímetro de la base del tallo de la planta dentro el sustrato Jiffy peat pellet.

Una vez que se completa el número de bandejas se transporta e introducen en la cámara de polietileno y se aplican un pequeño rocío para que se mantenga alta la humedad.

### **D) Condiciones ambientales**

La luz debe mantenerse con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad de luz baja de cercana a los 3500 lux para lámparas led rojo + azul + blanco ( $85 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ).

Durante los primeros siete días después de la siembra es necesario que la humedad relativa se mantenga cercano al punto de saturación, mayor a 95% de humedad relativa.

La temperatura se debe mantener entre 25 °C y 30 °C.

## **E) Manejo de las plántulas**

La primera fertilización de las plántulas se realiza alrededor de los siete días después del trasplante, aplicando un pequeño rocío con agua antes de aplicar la solución fertilizante NPK y una aspersion con agua después de la fertilización.

A partir del décimo día se inicia abriendo parcialmente las cámaras durante las horas de oscuridad.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Crecimiento aéreo

Las variaciones en la concentración de sacarosa del medio *in vitro* llegan a mostrar un efecto considerable en el crecimiento del tallo, lo cual concuerda con lo presentado por Zimmerman *et al.* (2007), este autor menciona que se puede presentar un efecto de reducción en la longitud del tallo debido al incremento de la presión osmótica del medio de cultivo al incrementar la concentración de sacarosa en este. Además, la longitud del tallo se ve influenciada en gran parte por el crecimiento que se ha dado en la etapa *in vitro*. El crecimiento de los explantes durante las primeras semanas en el cuarto de crecimiento *in vitro* es lento, se acelera al llegar la tercera semana y se mantiene con un crecimiento constante y rápido a partir de la cuarta semana, aumentando considerablemente la longitud del tallo hasta llegar a la sexta semana de crecimiento. El crecimiento durante esta última fase puede ser tan rápido que las plantas pasan de una longitud de 2 a 6 cm de la cuarta a la sexta semana de edad. El tallo es una estructura muy importante para el almacenamiento de fotoasimilados que posteriormente son utilizados por la planta para el crecimiento y desarrollo.

Aguilar *et al.* 2019 menciona que en condiciones *ex vitro* el tallo es la estructura la planta que almacena foto asimilados y almidón que son utilizados para la nutrición de los brotes nuevos en sistemas de propagación vegetativa convencional, por lo tanto, el grosor del tallo es una variable muy importante en *ex vitro*. Sin embargo, el grosor del tallo mostró muy poca variación entre las corridas, el efecto principal que se reflejó en el tratamiento empleado al sustrato, dónde al utilizar la solución bioestimulante más funguicida se presentó un menor grosor que al usar agua destilada. Este comportamiento puede estar explicado por un leve grado de fitotoxicidad presentada por alguno de los ingredientes activos en la solución. Según menciona Sanz (1970), el producto Vitavax® ha llegado a mostrar efectos fitotóxicos en la aplicación para el tratamiento de semillas en el cultivo de tomate, tanto cuando se aplica directamente en la semilla, como cuando se aplica al suelo.

El área foliar y el peso fresco aéreo se comportaron de forma similar, dado que en esta etapa las hojas representan la mayor porción de la plántula en cuanto a volumen. Los factores edad de crecimiento y la intensidad de luz tuvieron efectos significativos sobre estas variables, así como la concentración de sacarosa en el medio y el fotoperíodo. La edad de crecimiento se relaciona directamente con el aumento de tamaño de las plántulas en este caso llegando a mostrar un incremento pronunciado en cuanto a la dimensión de sus hojas y el peso de las plantas. Sin embargo, factores como la intensidad de luz y la concentración de sacarosa muestran una reducción al incrementar los niveles de estos. La intensidad de luz juega un papel esencial en el crecimiento de las plántulas, se requiere de un nivel mínimo para que se presente una activación fotosintética óptima, no obstante, cuando se maneja la luz a niveles elevados y excesivos en las etapas iniciales de la aclimatación de las vitoplantas, la eficiencia del proceso tiende a disminuir principalmente asociado a la muerte por marchitez de las plantas (Jorge *et al.* 2000).

Las variables de número de nudos y número de hojas se encuentran estrechamente relacionadas, dado que en el desarrollo de las plantas de yuca se origina una hoja a partir de cada nudo. En el caso de ambas variables, el factor concentración de sacarosa en el medio de cultivo durante el crecimiento *in vitro* presentó un efecto significativo sobre la cantidad que se encontraron, reduciendo en número de nudos y de hojas conforme se aumenta la concentración en el medio, siendo el aumento de la presión osmótica del medio el responsable de la reducción en cuanto al desarrollo de las plántulas (Zimmerman *et al.* 2007). En el caso del factor edad el crecimiento, tanto para el número hojas, como para el número de nudos mostró un comportamiento cuadrático, el cual apunta a que la tasa desarrollo de las vitoplantas se reduce a partir de la quinta semana aproximadamente. El factor intensidad de luz marcó un efecto altamente significativo sobre el número de hojas, se presentó una reducción considerable en el número de hojas de las plántulas sometidas al nivel alto de radiación. Las plantas bajo el régimen de intensidad de luz alta perdieron hojas en los primeros días tras el trasplante, lo cual pudo deberse por una mayor transpiración que provocó la caída principalmente de las hojas bajas. La intensidad de luz alta es perjudicial para las plántulas

principalmente en los primeros días en las que son expuestas al ambiente *ex vitro* (Jorge *et al.* 200). Según menciona el mismo autor, los principales daños se pueden presentar en el mantenimiento del balance del agua dentro de la planta por un pobre desarrollo entre las conexiones de raíz, tallo y hojas. Un efecto que se observó en las cámaras que se ubicaban en las zonas de alta intensidad es que se encontraba agua precipitada en la base de estas, mientras que en las cámaras de baja intensidad no se observó este comportamiento, lo cual está explicado por los cambios en la temperatura y la humedad dentro de las cámaras.

## **5.2 Crecimiento radical**

Las variables relacionadas con el crecimiento de la raíz presentaron un comportamiento similar, en términos de factores. En ambos casos la concentración de sacarosa y el tratamiento al sustrato presentaron mejores resultados cuando se emplearon los niveles bajos. Según menciona Callejas *et al.* (2012), existe una estrecha relación entre el crecimiento radical y el comportamiento aéreo de una planta, por lo que la reducción del crecimiento radical cuando se utilizan niveles altos de estos factores está relacionado a la reducción en cuanto al crecimiento aéreo de las plántulas. En cuanto a los factores relacionados con la radiación se presentó un incremento del tamaño de las raíces al emplear fotoperíodos más largos en duración de luz y con los niveles de intensidad de luz baja. Ambos factores juegan un papel crucial en cuanto a la adaptación de las plántulas al ambiente *ex vitro*, dado que estas presentan una baja eficiencia fotosintética (Pospisilová *et al.* 1999), se debe utilizar niveles que promuevan el aumento de la actividad fotosintética. La reducción de la intensidad de la luz mientras se incrementa el fotoperíodo puede ser aumentar el desempeño fotosintético y el rendimiento de algunos cultivos (Kelly *et al.* 2020).

El desarrollo de raíces funcionales es uno de los principales objetivos durante la aclimatación temprana de las plántulas (Pospisilová *et al.* 1999). Los factores edad de crecimiento, tratamiento del sustrato, regulador de crecimiento y fotoperíodo tuvieron efecto sobre el número de raíces de las plántulas. La edad de crecimiento presentó un comportamiento cuadrático, lo cual indica que la tasa de

desarrollo de raíces se reduce alrededor de los 32 días de cultivo y aunque el crecimiento de estas continua. Un aspecto importante del manejo de las raíces es la poda antes del trasplante, tal como indica Yoon et al. (2001), esta práctica aparte de facilitar el manejo en la siembra reducirá la pérdida de raíces por daños mecánicos durante el trasplante a sustrato. En el caso del uso de reguladores de crecimiento el efecto principal se observó en el desarrollo de las raíces, donde el AIB presentó un efecto positivo sobre el desarrollo radical, lo cual concuerda con lo presentado por Alagesaboopathi (2012) y Naranjo y Fallas (2018), quienes encontraron una mayor tasa de plantas enraizadas cuando se empleaba AIB en concentraciones entre 1000 y 1500 ppm. No obstante, el uso del AIA representó una reducción en el número de raíces de las plántulas, lo cual puede deberse al efecto perjudicial que presentan las auxinas sobre los tejidos cuando se emplean concentraciones altas de estas (Grossmann 2007). El AIB suele ser más empleado ya que cuenta con la ventaja de ser más estable al entrar en contacto con el sustrato y de no ocasionar toxicidad en un rango más amplio de concentraciones (Castrillón et al. 2008). De la misma forma, según lo encontrado por Jiménez et al. (2019), cuando se empleó una concentración de 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA se obtuvo un menor desarrollo de raíces de *Dahlia sp* en comparación a cuando se utilizó en concentraciones inferiores e inclusive cuando este no se utilizó.

### **5.3 Sobrevivencia**

La sobrevivencia que se obtuvo como media en el experimento fue alta (>90%). El único factor que presentó un efecto significativo sobre la sobrevivencia fue la concentración de sacarosa, lo cual estuvo muy relacionado con un pobre crecimiento y desarrollo de las vitroplantas sometidas a las concentraciones altas de sacarosa en el medio de cultivo. Según menciona Candra et al. (2010), la concentración de carbohidratos en el medio es uno de los principales factores con influencia sobre la aclimatación de las vitroplantas, dado que durante el periodo de crecimiento *in vitro* estas crecen de forma heterótrofa y deben hacer el cambio hacia la forma de crecimiento autótrofa. De igual forma, el mismo autor menciona que las concentraciones entre 20 g.L<sup>-1</sup> y 30 g.L<sup>-1</sup> tienden a ser más favorables que las concentraciones superiores a 30 g.L<sup>-1</sup>. Otros factores que influyen drásticamente

sobre la sobrevivencia de las plantas son la intensidad lumínica, la tasa de transpiración y la exposición ante microorganismos potencialmente perjudiciales (Pospíšilová *et al.* 1999). Por lo tanto, los principales esfuerzos para mantener una alta tasa de sobrevivencia deben estar enfocados en estos factores, propiciando la paulatina corrección de las anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas desarrolladas durante el período *in vitro* de forma que las plántulas se adapten al ambiente *ex vitro*.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo con estos resultados se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Los factores de crecimiento *in vitro*, concentración de sacarosa en el medio de cultivo y edad de crecimiento, fueron los factores que mostraron un mayor efecto en el crecimiento de las plántulas durante el proceso de aclimatación.
2. El factor de crecimiento *in vitro*, concentración de sacarosa en el medio de cultivo, afectó significativamente la sobrevivencia de las plántulas durante el proceso de aclimatación.
3. La edad de crecimiento *in vitro* óptima para la aclimatación vitroplantas de yuca fue de 39 días.
4. La combinación de los factores de aclimatación en ambiente controlado, baja intensidad lumínica ( $85 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y un fotoperiodo de 16 horas, propiciaron las mejores condiciones para el crecimiento de las plántulas de yuca durante el proceso de aclimatación.
5. La aplicación a las plántulas de yuca de ácido indolbutírico (AIB) en concentración de 1000 ppm favoreció la formación de raíces, mientras que la aplicación de ácido indolacético (AIA) en concentración de 1000 ppm redujo la formación de éstas durante el proceso de aclimatación.
6. La hidratación del Jiffy peat pellet con agua destilada favoreció significativamente el crecimiento de las plántulas de yuca en comparación con el uso de la solución ((Radigrow®; en dosis de  $2 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ), un bioestimulante (Nutrisorb® L; en dosis de  $2 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y un fungicida (Vitavax® - 300; en dosis de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

## 7. RECOMENDACIONES

- Las herramientas de diseños de experimentos (DOE) proporcionan una forma eficiente de realizar investigaciones para mejorar y optimizar la calidad de los procesos que se llevan a cabo en distintas fases del Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Instituto Tecnológico de Costa Rica Campus Tecnológico Local San Carlos.
- Realizar subcultivos con explantes uniformes para establecer una población de plantas *in vitro* homogéneas como base de estudio.
- Revisar la metodología para la toma de muestras de materia seca para plantas *in vitro*.
- El diseño de cribado permite jerarquizar según la importancia del efecto hasta de 48 factores y proporciona detalles relevantes sobre la relación entre dichos factores y su efecto sobre la calidad de un proceso.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A; Vincent, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. 38p.
- Aguilar, E; Segreda, A; Saborío, D; Morales, J; Chacón, M; Rodríguez, L; Acuña, P; Torres, S; Gómez, Y. 2017. Manual del cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) (en línea). San José, Costa Rica. INTA. 91 p. Consultado 30 jul. 2019. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10918.pdf>.
- Alagesaboopathi, C. 2012. Influence of indole acetic acid and indole butyric acid on root development and status of *Andrographis elongate* (Vahl) T. and. Endemic medicinal plant of india. International Journal of Bioscience. 2 (4): 75-81.
- Álvarez, E; Pardo, J; Mejía, J; Santos de Oliveira, S; Zacher, M; Cardozo, L; Gómez, Y. 2015. Manejo del 'cuero de sapo' enfermedad limitante de la yuca. Cali, Colombia. CIAT. 12 p.
- Aristizábal, J; Sanchez, T. 2007. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca (en línea). Boletín FAO. Roma, Italia. N.º 2007-163. 134 p. Consultado 4 ago. 2019. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-a1028s.pdf>.
- Azcón, C; Cantos, M; Troncoso, A; Barea, J. 1997. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. Scientia Horticulturae 72 (1): 63-71.
- Bonilla, M; Sánchez, S; Pachón, J. 2015. Evaluación de sustratos orgánicos para la aclimatación y endurecimiento de vitroplantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 6 (2): 31-36.
- Callejas, R; Rojo, E; Benavidez, C; Kania, E. 2012. Crecimiento y distribución de raíces y su relación con el potencial productivo de parrales de Vides de Mesa. Agrociencia. 46(1): 23-35.
- Carvalho, M. Oliveira, E; Souza, A; Pereira, J; Diamantino, M; Oliveira, S. 2017. Cleaning cassava genotypes infected with cassava frogskin via *in vitro* shoot tip culture. Genetics and Molecular Research. 16 (2): 1-17.
- Castañeda, O; Ogawa, S; Medina, A; Chavarriaga, P; Gómez, M. 2017. A simple hydroponic hardening system and the effect of nitrogen source on the acclimation of *in vitro* cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant. DOI: 10.1007/s11627-016-9796-z
- Castillo, A. 2008. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo (en línea). Tacuarembó, Uruguay. Consultado 12 sep. 2019. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>.

- Castrillón, J; Carvajal, E; Ligarreto, G; Magnitskly, S. 2008. El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) en diferentes sustratos. *Agronomía Colombiana*. 26(1): 16-22.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2007. Cassava Research and Development in Asia: Exploring New Opportunities for and Ancient Crop. Bangkok, Thailandia. CIAT. 663 p.
- Cock, J; Wholey, D; Lozano, J; Toro, J. 1976. Sistema rápido de propagación de yuca (en línea). Cali, Colombia. *Ciat*. 13 p. Consultado 18 oct. 2019. Disponible en <https://core.ac.uk/download/pdf/132681965.pdf>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. FAOSTAT (en línea). Roma, Italia. Consultado 4 ago. 2019. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013. Save and Grow: Cassava (en línea). Roma, Italia. 122 p. Consultado 2 ago. 2019. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i3278e.pdf>.
- Gómez, Y; Torres, S; Álvarez, E; Pardo, J; Aguilar, E; Solórzano, J. 2015. Manejo de semilla y de la enfermedad de cuero de sapo en yuca (en línea). San José, Costa Rica. INTA. 22 p. Consultado 3 ago. 2019. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-1811.pdf>.
- Grossmann, K. 2007. Auxine Herbicide Action. *Plant Signal Behavior*. 2(5): 421-423.
- Hazarika, B. 2006. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*. 108 (2): 105-120.
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Costa Rica). 2020.
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Costa Rica). 2015. VI Censo Nacional Agropecuario: Resultados Generales. San José, Costa Rica. INEC. 113 p.
- Jiménez, L; Fonseca, M; García, A; Infante, S; Vázquez, J. 2019. Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en el enraizamiento *in vitro* de *Dahlia sp.* *Cultivos Tropicales*. 40 (1):
- Jorge, M; Robertson, A; Mashingaidze, A; Keogh, E. 2000. How *in vitro* light affects growth and survival of *ex vitro* cassava. *Annals Applied Biology*. 137: 311-319.
- Kelly, N; Choe, D; Meng, Q; Runkle, E. 2020. Promotion of lettuce growth under an increasing daily light integral depends on the combination of the photosynthetic photon flux density and fotoperiod. *Scientia Horticulturae*. 272.
- Laimer, M; Rücker, W. 2003. *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Nueva York, Estados Unidos. Springer. 260 p.

- Maruthi, M; Whitfield, C; Otti, G; Tumwegamire, S; Kanu, E; Legg, J; Mkamilo, G; Kawuki, R; Benesi, I; Zacarias, A; Munga, T; Mwatuni, F; Mbugua, E. 2019. A method for generating virus-free cassava plants to combat viral disease epidemics in Africa. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 105: 77-87.
- Mongomake, K; Doungous, O; Khatabi, B; Fondong, V. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. *SpringerPlus*. 4 (477). Doi: <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1272-4>
- Mora, S. 2019. Informe Comercio Exterior del Sector Agropecuario 2017-2018 (en línea). San José, Costa Rica. SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 16 p. Consultado 12 ago. 2019. Disponible en <http://www.sepsa.go.cr/docs/2019-004-Comercio Exterior Sector Agropecuario 2017-2018.pdf>
- Mroginski, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* (en línea). In Roca, W; Mroginski, L (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 969 p. Consultado 4 oct. 2019. Disponible en [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/Cultivo de tejidos en la agricultura.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo de tejidos en la agricultura.pdf)
- Murashige, T. 1977. Clonal Crops Through Tissue Culture. In Barz, W; Reinhard, E; Zenk, M (eds.). *Plant Tissue Cultures and Its Bio-technological Application*. Springer-Verlag. Berlín, Alemania. 419 p.
- Naranjo, C; Fallas, E. 2018. (Proceedings). International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated plants. (7, 2018, Lavras, Minas Gerais, Brazil). Minas Gerais, Brazil. 234 p.
- Ospina, B; Ceballos, H; Álvarez, E; Bellotti, A; Calvert, L; Arias, V; Cadavid, L; Pineda, B; Llano, Germán; Cuervo, M. 2002. La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 586 p.
- Pospíšilová, J; Tichá, I; Kadlec, P; Haisel, D; Plzákova, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biología Plantarum*. 42 (4): 481-497.
- Shiji, R; James, G; Sunitha, S; Vandhanaand, A; Muthuraj, R. 2014. Effect of NAA and IBA on *in vitro* regeneration and hardening in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Journal of Root Crops*. 40 (2): 12-20.
- Zimmerman, T; Williams, K; Joseph, L; Wiltshire, J; Kowalski, J. Rooting and Acclimatization of Cassava (*Manihot esculenta*) *ex vitro*. (Proceedings). International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species. (1, 2007, Florida, USA). Daytona Beach, Florida, USA.