

ACLIMATIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE YAMPÍ (*Dioscorea trifida*) Y ÑAME (*D. alata*) PRODUCIDAS *in vitro*^{1/}

Ana Gabriela Chacón, Luis Gómez*, Sergio Torres*, Francisco Saborío^{2/*}

Palabras clave: *Dioscorea*, aclimatización, *in vitro*, humedad, paclobutrazol.

Keywords: *Dioscorea*, acclimatization, *in vitro*, humidity, paclobutrazol.

Recibido: 30/08/05

Aceptado: 14/03/06

RESUMEN

La siembra de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) en Costa Rica se realiza primordialmente con fines de exportación a Europa y Norteamérica. La producción nacional se ve seriamente limitada por la falta de semilla libre de plagas y enfermedades. Aunque la producción *in vitro* de semilla representa una alternativa, una sobrevivencia baja de las plántulas durante la aclimatización limita la aplicación comercial de esta tecnología. Se evaluó el efecto del paclobutrazol, la edad al trasplante, la humedad durante el período de aclimatización y el uso de un antitranspirante. Se encontró que la edad al trasplante y la regulación de la humedad durante las primeras etapas de la fase de aclimatización son factores importantes en la sobrevivencia de las plántulas de *Dioscorea* producidas *in vitro*, y su crecimiento durante las primeras 6 semanas *ex vitro*.

INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea alata*) y el yampí (*D. trifida*) son originarios de las selvas del sureste de Asia, la región boscosa de África occidental y la Cuenca Amazónica. Se caracterizan por tener un tallo subterráneo el cual emite tallos aéreos,

ABSTRACT

Acclimatization of *in vitro* produced yampí (*Dioscorea trifida*) and ñame (*D. alata*) plants. Yams (*Dioscorea trifida* and *D. alata*) are cultivated in Costa Rica mainly as export products to North America and Europe. Production is seriously limited by the lack of high quality seed. *In vitro* micropropagation represents a solution to this problem, however this technology requires to be optimized before it can be implemented, since plantlets' survival during acclimatization is very poor. In this study, the addition of paclobutrazol, the age of plantlets at the time of transplant to the greenhouse, the control of humidity during acclimatization, and the use of an anti-transpirant were evaluated. It was found that the age of the plantlets at the time of transplant and the control of humidity during acclimatization are important factors for plantlets' survival and growth during the 6 first weeks *ex vitro*.

raíces y tubérculos que constituyen una fuente rica de carbohidratos (León 1978).

Su producción comercial es de gran importancia alimenticia en países en desarrollo de las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia y el Caribe (Ammirato 1984). En Costa Rica, su producción es con fines de exportación a

1/ Parte de la tesis de licenciatura de la autora. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: saboriop@cariari.ucr.ac.cr

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica

EE.UU., Europa y el Caribe, donde este producto es consumido por comunidades de origen tropical. Las exportaciones de *D. trifida* y *D. alata* en el 2004 fueron cercanas a 1,5 y 10,5 millones de dólares, respectivamente (Procomer 2005).

Tradicionalmente el ñame ha sido propagado asexualmente a partir de tubérculos (enteros o fragmentados) o de cortes de tallo (esquejes); sin embargo, estos métodos son ineficientes para el abastecimiento de material propagativo y no permiten una buena calidad fitosanitaria del mismo (Forsyth y Van Standen 1982). Las técnicas de propagación *in vitro* han resultado de gran utilidad para la solución de estos problemas, ya que permiten una rápida multiplicación de material libre de plagas y enfermedades (Ammirato 1984).

En el proceso de propagación *in vitro* de *Dioscorea*, durante la etapa de aclimatización de las plántulas, se reporta de 20-50% de plántulas que no sobreviven, lo que dificulta la aplicación comercial de esta tecnología (Chacón 1999).

El cultivo de tejidos altera algunas características morfológicas de las plántulas *in vitro* tales como la composición química de la capa epicuticular (Preece y Sutter 1990), la forma y distribución de los estomas (Ziv 1990), y la estructura de las hojas y los tallos (Pierik 1987). También afecta características fisiológicas como la actividad estomática y la funcionalidad de las raíces y las hojas (Díaz-Pérez *et al.* 1995, Huylenbroeck y Debergh 1996, Chacón *et al.* 2000). Estos cambios dificultan la capacidad de algunas plántulas para adaptarse a las condiciones externas, y por ello un número significativo de plantas micropropagadas no sobrevive la etapa de aclimatización (Preece y Sutter 1990).

A partir de los años 90, han sido desarrolladas técnicas de aclimatización para aumentar la sobrevivencia de las plántulas durante esta etapa. Estas buscan limitar la pérdida de agua que sufren las plántulas al ser trasplantadas al invernadero, ya sea mediante la modificación del ambiente externo al cual son transferidas, o mediante tratamientos directos a las plantas

antes o después de su remoción del cultivo *in vitro*, que normalicen su actividad fisiológica y su composición estructural. Algunas de las técnicas utilizadas para modificar el ambiente externo son la reducción paulatina de la humedad relativa y el aumento gradual en la luminosidad (Preece y Sutter 1990). Para normalizar la actividad fisiológica se recomienda el uso de antitranspirantes (Voyiatzis y McGranaham 1994), para reducir así la pérdida de agua de las plantas, la adición de osmoreguladores y de retardadores de crecimiento, principalmente del grupo de los triazoles -como el paclobutazol- que bloquean la síntesis de giberelinas y aumentan la resistencia al estrés por factores bióticos, esto aparentemente asociado a un incremento de antioxidantes en la planta (Ziv 1990, Henderson *et al.* 1993, Torres y Mogollón 2002).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del paclobutrazol, la humedad, la edad al trasplante y el uso de un antitranspirante, con el fin de aumentar la sobrevivencia, durante la aclimatización, de plántulas de *D. trifida* y *D. alata* micropropagadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

El material inicial fue plantas de *Dioscorea trifida* y *D. alata* establecidas *in vitro* y con 4 semanas de cultivo luego de su última transferencia. A estas plántulas se les eliminó el nudo basal, se individualizaron los nudos restantes, y estos fueron colocados en los diferentes tratamientos.

El medio de cultivo fue el Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con mioinositol (100 mg l⁻¹), tiamina (0,5 mg l⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mg l⁻¹), piridoxina (0,5 mg l⁻¹), sacarosa (4%) y solidificado con agar (7 g l⁻¹). El pH fue ajustado a 5,9 antes de autoclavar el medio. Las plantas se cultivaron a 25°C y con un fotoperíodo de 12 horas.

Efecto del paclobutrazol *in vitro* y la edad al trasplante

Los tratamientos consistieron en plántulas con 4, 7, 10 y 13 semanas de cultivo en el medio MS suplementado con paclobutrazol en las siguientes concentraciones: 0, 0,5, 1,0 y 2,0 mg l⁻¹. Paclobutrazol es comercializado bajo las marcas Cultar® o Bonzi®.

Efecto del tiempo de permanencia en el tunel de aclimatización y del antitranspirante

Plántulas de 7 semanas de edad de cultivo en el medio MS fueron trasplantadas al invernadero. Los tratamientos consistieron en diferentes tiempos de permanencia en el tunel de aclimatización (0, 2, 4 y 6 semanas) en combinación con la aplicación del antitranspirante Primafresh® en 2 concentraciones (0 y 10%).

Al momento de transferir las plántulas al invernadero, estas fueron sembradas en un sustrato esterilizado compuesto por fibra de coco:suelo en proporción 1:1. Las plántulas se cubrieron con una tela de “pelón” para protegerlas de la deshidratación y los cambios bruscos de temperatura y se colocaron en un túnel de polietileno. Se regaron diariamente y fueron asperjadas semanalmente con una solución de Kilol® (1 ml l⁻¹) + Fosnutren® (1 ml l⁻¹). Las condiciones en el invernadero durante los meses en que se llevó a cabo los ensayos fueron de 30-35°C (temperatura diurna) y 20-25°C (temperatura nocturna), con una humedad relativa de 70-90%.

Al momento del trasplante y a las 4 semanas de permanencia de las plántulas en el invernadero, se evaluó el número de hojas y la altura. Solamente a las 4 semanas se evaluó también el peso fresco, el peso seco y la sobrevivencia. Para la determinación del peso seco, las muestras fueron colocadas en una estufa a 58°C por 48 h.

Se determinó el crecimiento de las plántulas durante estas 4 semanas mediante el cálculo del porcentaje de incremento de cada una

de las variables evaluadas según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de incremento: } \frac{V_2 - V_1}{V_1} * 100 \quad (F1)$$

V₁: valor al momento de la remoción de las plántulas del medio de cultivo.

V₂: valor después de 4 semanas de aclimatización.

Para este ensayo la evaluación del crecimiento durante el proceso de aclimatización se realizó hasta las 6 semanas.

Análisis estadístico

En ambos experimentos se utilizó un diseño irrestricto al azar con 4 repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 10 plántulas. Se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) y se llevó a cabo una prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para verificar diferencias entre los tratamientos.

RESULTADOS

Efecto del paclobutrazol

La adición de paclobutrazol al medio de cultivo tuvo un efecto negativo sobre la sobrevivencia de las plantas de *D. trifida* en el proceso de aclimatización (p<0,05). La sobrevivencia de las plántulas disminuyó en 79, 78, 65 y 64% al incrementarse la dosis del retardador de crecimiento en 0, 0,5, 1 y 2 mg l⁻¹, respectivamente. No así para *D. alata*, en cuyo caso no se observó efecto sobre la sobrevivencia de las plántulas (datos no mostrados).

La adición de paclobutrazol al medio de cultivo durante la fase III tuvo un efecto significativo sobre el número de hojas, la altura, el peso fresco y la acumulación de materia seca en plantas de *D. trifida* (p<0,05); y sobre la altura, el peso fresco y la acumulación de materia seca en *D. alata* (p<0,05).

En ambas especies se observó una relación lineal inversa entre la altura y la dosis del retardador (Figura 1). Para el caso del peso seco, el comportamiento de las 2 especies fue diferente. En *D. trifida*, la relación entre el uso del paclobutrazol y el peso de las plantas fue lineal y positiva; mientras que en *D. alata* se observó más bien un comportamiento de tipo cuadrático (Figura 2).

Se observó una variación en la forma de la hoja en las plántulas de *D. alata* producidas en medio de cultivo con paclobutrazol, en cualquiera de las 3 dosis evaluadas. Estas presentaban lóbulos más redondeados y pronunciados que le daban forma de corazón (Figura 3).

En ninguna de las especies se observó diferencias significativas entre los tratamientos,

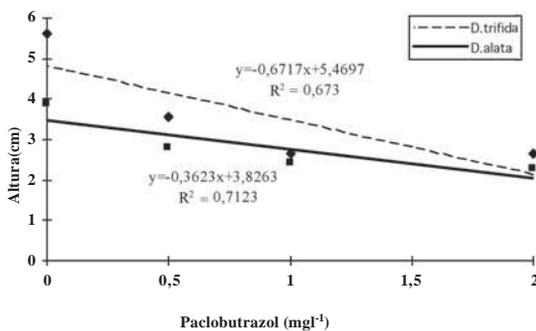


Fig. 1. Efecto del paclobutrazol sobre la altura de plántulas de *D. trifida* y *D. alata* producidas *in vitro*.

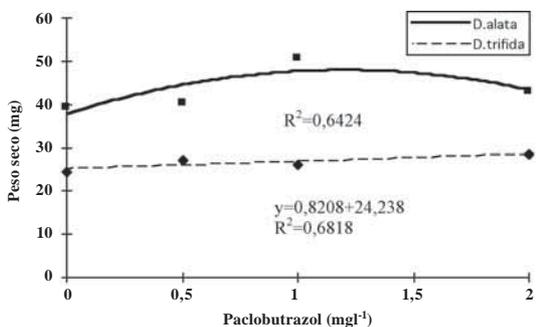


Fig. 2. Efecto del paclobutrazol sobre el peso seco de plántulas de *D. trifida* y *D. alata* producidas *in vitro*.

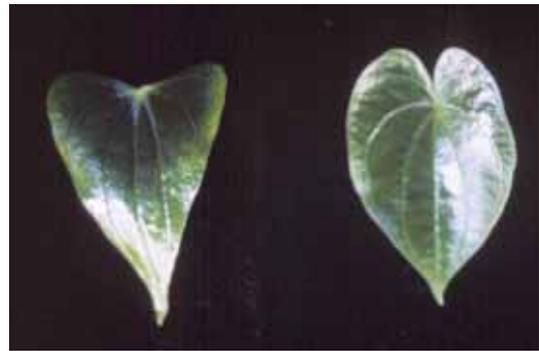


Fig. 3. Forma de las hojas de plántulas de *D. alata* producidas *in vitro* en medio de cultivo sin paclobutrazol (izquierda) y con regulador (derecha).

en el crecimiento de las plántulas, durante el proceso de aclimatación por efecto de la adición de paclobutrazol al medio de cultivo. Tampoco se observó efectos relacionados con la interacción entre la edad y la adición del retardador de crecimiento (datos no mostrados).

Efecto de la edad

En *D. trifida* se observó que la edad de trasplante al invernadero tuvo un efecto importante sobre la sobrevivencia de las plántulas en el proceso de aclimatación. Conforme la edad fue mayor, menor fue la sobrevivencia de las mismas, con una diferencia cercana al 50% entre las plántulas de 4 semanas con respecto a las de 13 semanas (Figura 4).

No fue así para el caso de *D. alata*, donde a pesar de que hubo diferencias en la sobrevivencia de las plántulas de acuerdo a la edad ($p < 0,05$), la sobrevivencia fue cercana al 80% en cada concentración (datos no mostrados).

El número de hojas y la altura de las plántulas de *D. trifida* y *D. alata* producidas *in vitro* fue mayor conforme mayor fue la edad de estas. El peso fresco (datos no mostrados) y el peso seco (Figura 5) de las plántulas tanto de *D. trifida* como *D. alata* presentaron un comportamiento sigmoide. De 0-4 semanas las plántulas presentaron un crecimiento lento;

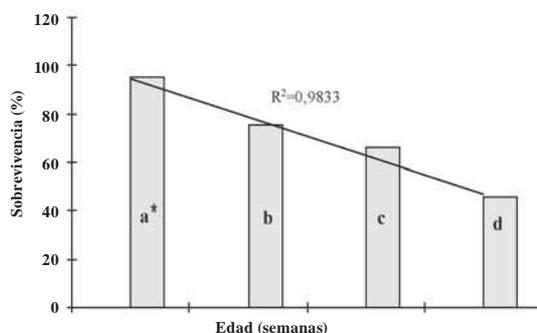


Fig. 4. Efecto de la edad al trasplante sobre la sobrevivencia durante el proceso de aclimatización de plántulas de *D. trifida* producidas *in vitro*. * Letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos a $p=0,05$.

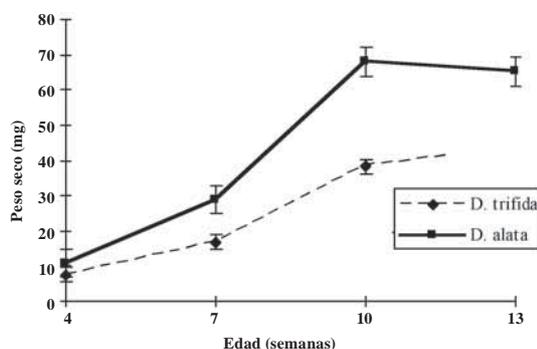


Fig. 5. Peso seco de plantas de *D. trifida* y *D. alata* producidas *in vitro* de acuerdo a su edad.

de 7-10 semanas este fue acelerado; y por último, a partir de la décima semana, las plántulas presentaron más bien una ligera disminución en el peso.

Las figuras 6 y 7 muestran la apariencia general de las plántulas de *Dioscorea* en los diferentes tratamientos, al momento que fueron removidas del medio de cultivo para ser trasplantadas al invernadero. Es posible apreciar como los resultados numéricos obtenidos en los tratamientos, tanto para el efecto de la edad como para el paclobutrazol, se ven reflejados en el aspecto de las plantas.

La edad de trasplante al invernadero tuvo un efecto importante en el desarrollo de las

plántulas, tanto de *D. trifida* (Figura 8) como de *D. alata* (Figura 9), durante el proceso de aclimatización ($p<0,05$). En general, para ambas especies se encontró que las plántulas que fueron removidas del cultivo *in vitro* a las 4 ó 7 semanas presentaron un crecimiento superior (incremento porcentual en las variables evaluadas) con respecto a las que fueron removidas a las 10 ó 13 semanas.

El crecimiento mayor de las plántulas de *D. trifida*, luego de ser trasplantadas al invernadero, se obtuvo cuando se utilizó plántulas de 4 y 7 semanas, mientras que en *D. alata* fue con la edad de 7 semanas. Las plántulas de 10 y 13 semanas presentaron valores inferiores a cero en algunas de las variables evaluadas (Figuras 8 y 9).

En *D. alata* un $65\pm 5\%$ de las plántulas trasplantadas al invernadero con 10 semanas de edad tuberizaron durante la fase de aclimatización, en comparación con un 0% de las plántulas de 4 y 7 semanas de edad y un $15\pm 9\%$ de las plantas de 13 semanas. Estos microtubérculos fueron colocados en una cámara de germinación, y al cabo de 4 semanas el 50-60% de ellos había brotado.

Efecto de la humedad

El tiempo de permanencia de las plántulas de *Dioscorea* en el túnel de polietileno, afectó su sobrevivencia y crecimiento durante la fase de aclimatización ($p<0,05$).

El efecto fue más evidente en *D. alata*, donde la variación en la sobrevivencia, de acuerdo al tiempo de permanencia de las plántulas en el túnel, fue casi de un 25%. Según la curva trazada a partir de los resultados obtenidos con los tratamientos, la sobrevivencia de *D. alata*, durante la aclimatización, se incrementa conforme mayor es el tiempo que las plántulas son mantenidas dentro del túnel de polietileno, hasta llegar a un máximo a las 5 semanas, a partir de ese momento la sobrevivencia disminuye. Para *D. trifida*, a pesar que el efecto



Fig. 6. Apariencia, según la edad, de las plantulas de *D. trifida* producidas *in vitro* utilizando distintas dosis de paclobutrazol



Fig. 7. Apariencia, según la edad, de las plantulas de *D. alata* producidas *in vitro* utilizando distintas dosis de paclobutrazol.

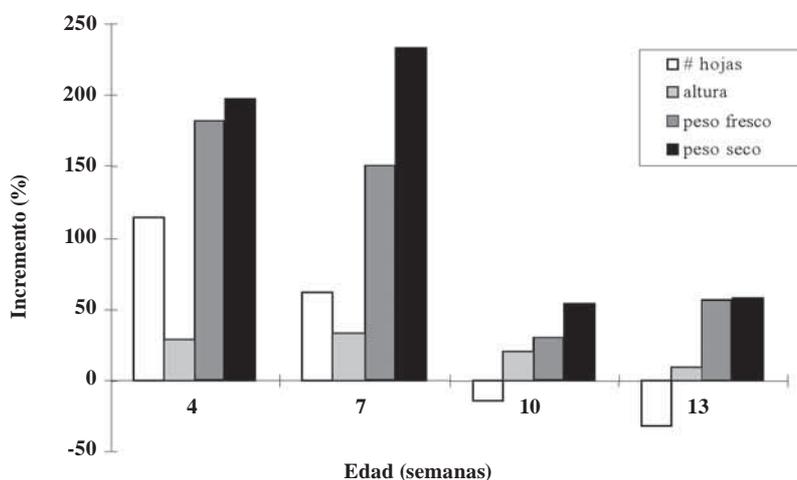


Fig. 8. Efecto de la edad al trasplante al invernadero sobre el crecimiento durante la fase de aclimatización de plantas de *D. trifida* producidas *in vitro*.

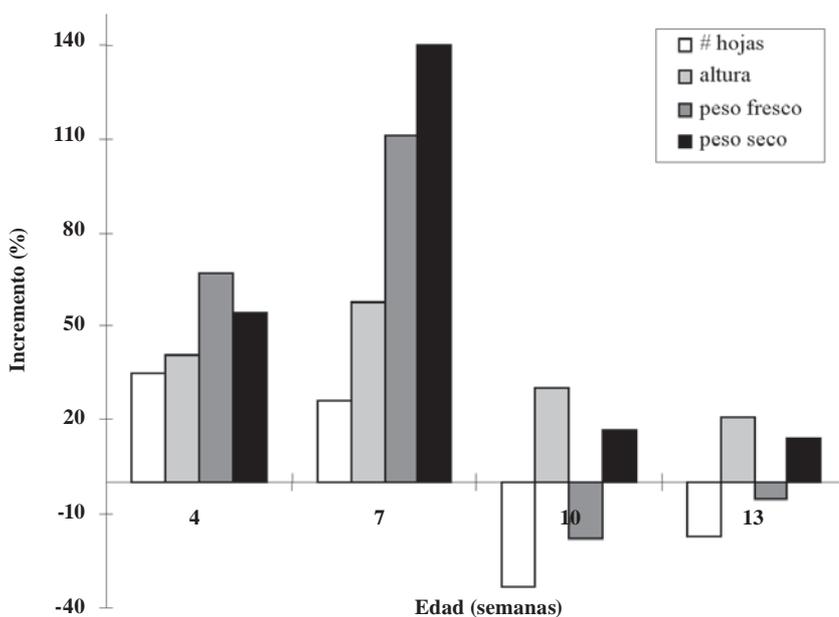


Fig. 9. Efecto de la edad al trasplante al invernadero sobre el crecimiento durante la fase de aclimatización de plantas de *D. alata* producidas *in vitro*.

fue menos determinante, se obtuvo una curva similar a la de *D. alata* (Figura 10).

Además del efecto observado en la sobrevivencia de las plántulas, el tiempo de permanencia

en el túnel de polietileno, tuvo influencia sobre su crecimiento. En *D. trifida* se obtuvo un comportamiento cuadrático del incremento en el peso fresco de las plántulas, de acuerdo a la permanencia de

estas dentro del túnel. A partir de la curva trazada se determinó que el crecimiento mayor se obtuvo cuando las plántulas permanecieron 3 semanas en el túnel de aclimatización. La magnitud de la variación entre tratamientos con respecto a la altura y el número de hojas fue baja (Figura 11).

Para *D. alata*, se encontró variaciones bastante evidentes en cuanto al incremento en el peso fresco y el número de hojas de las plántulas. El incremento mayor en el peso fresco de las plántulas se obtuvo cuando estas permanecieron de 3 a 4 semanas en el túnel; mientras que el incremento mayor en el número de hojas se dio cuando permanecieron de 4 a 5 semanas.

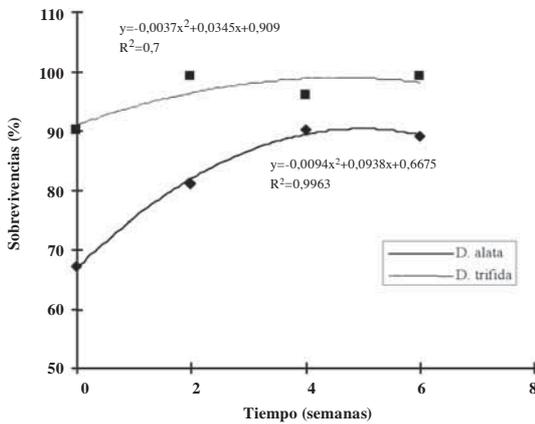


Fig. 10. Efecto del tiempo de permanencia de plántulas de *D. alata* y *D. trifida* en el túnel de aclimatización sobre la sobrevivencia.

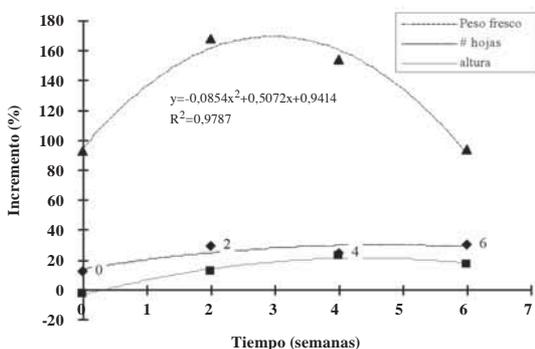


Fig. 11. Efecto del tiempo de permanencia de plántulas de *D. trifida* en el túnel de polietileno sobre su crecimiento.

Con respecto a la altura, se observó un comportamiento directamente proporcional entre el incremento en altura y el tiempo de permanencia de las plántulas en el túnel (Figura 12).

Efecto del antitranspirante

No hubo efecto del tratamiento con el antitranspirante, durante la fase de aclimatización, sobre la sobrevivencia o el desarrollo de las plántulas de *Dioscorea* micropropagadas.

DISCUSIÓN

Efecto del paclobutrazol

La incorporación de paclobutrazol en el medio de cultivo se realizó con el objetivo de aumentar los índices de sobrevivencia, durante la etapa de aclimatización, cuyo rango reportado oscilaba entre 50-70 % (Chacón 1999).

Al adicionar esta sustancia el crecimiento y desarrollo de las plántulas de ñame y yampí se afectó visiblemente. La reducción observada en la altura de las plántulas (Figura 1), se atribuye al efecto inhibitor de este grupo de retardadores de crecimiento sobre la biosíntesis de las giberelinas, las cuales son responsables, entre otras cosas, de la elongación celular; y por lo tanto su uso resulta

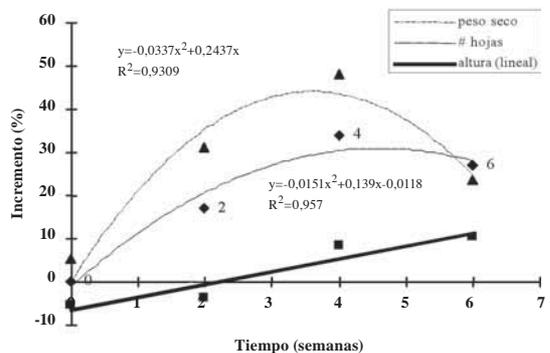


Fig. 12. Efecto del tiempo de permanencia de plántulas de *D. alata* en el túnel de polietileno sobre su crecimiento.

en plantas más compactas, con entrenudos más cortos (Davis y Curry 1991 y Arteca 1996). Esta respuesta es consistente con los resultados observados en plantas de banano y piña *in vitro* al utilizar triazoles en el medio de cultivo (Murali y Duncan 1995, Torres y Mogollón 2002).

Las variables peso fresco y peso seco también evidenciaron el efecto del paclobutrazol. La reducción en el peso fresco y el aumento en el peso seco al utilizar dosis crecientes de esta sustancia, muestra que las plántulas de ambos cultivos son menos suculentas cuando son cultivadas en presencia de paclobutrazol (Figuras 2 y 3). El comportamiento cuadrático observado en el peso de las plántulas es similar al que Henderson *et al.* (1993) obtuvieron con rosa *in vitro* y Murali y Duncan (1995) en banano también *in vitro*. Estos investigadores observaron un aumento en el peso seco de las plántulas con respecto al testigo cuando se utilizó una concentración de 1 mg l⁻¹ del retardador, y una disminución cuando la dosis se aumentó a 2 mg l⁻¹.

La variación en la forma de las hojas de *D. alata* con el paclobutrazol, demuestra el efecto del retardador sobre la morfología foliar, observada también en trigo, donde se da una reducción en la longitud de las hojas y un incremento en el ancho y grosor (Gao *et al.* 1988). Por su parte, en piña se reporta una reducción del grosor de las hojas y un aumento en el ancho de las células guarda (Torres y Mogollón 2002).

Contrario a lo esperado (Gao *et al.* 1987 y Smith *et al.* 1991) los cambios en altura, suculencia y morfología foliar inducidos por el paclobutrazol, no favorecieron la sobrevivencia durante la aclimatización de *D. trifida* y *D. alata*, y parecen haber reducido la adaptabilidad de estas plántulas a los cambios de temperatura, humedad y luminosidad.

Cabe resaltar que una interpretación más completa de los resultados obtenidos es difícil, a la luz de que muchos de los procesos relacionados con el mecanismo de acción de los triazoles son aún desconocidos, y los efectos de la aplicación exógena de estos compuestos no se comprenden en su totalidad.

Efecto de la edad al trasplante

Los resultados demostraron que la edad al trasplante al invernadero, es un factor determinante sobre la sobrevivencia y crecimiento de plántulas de *D. trifida* producidas *in vitro*. Al aclimatizar plántulas de 4 semanas de edad se incrementa la sobrevivencia a valores mayores al 95%, mientras que con plántulas de 13 semanas la sobrevivencia es cercana al 50%. En el caso de *D. alata* la edad no resultó ser importante sobre la sobrevivencia de las plántulas.

En ambas especies se observó que la edad al trasplante tiene un efecto importante sobre el crecimiento de las mismas durante la aclimatización. Este comportamiento puede estar ligado con la curva de crecimiento *in vitro* de las plántulas de ambas especies (Figura 5). Cuando estas son removidas antes de la séptima semana de cultivo *in vitro*, las plántulas experimentan la fase de crecimiento exponencial en el invernadero, registrándose tasas de crecimiento altas después de 4 semanas de aclimatización; mientras que si son removidas del cultivo *in vitro* después de la décima semana, la etapa de crecimiento exponencial habrá ocurrido cuando las plántulas aún se encuentran *in vitro*. Entonces al trasplantarse al invernadero el crecimiento que estas experimentan es muy reducido e inclusive podrían estar comenzando un proceso de senescencia o tuberización, como se observó en las plántulas de *D. alata*.

Los valores negativos en el incremento del número de hojas, de las plántulas removidas del cultivo *in vitro* a las 10 y 13 semanas, podrían estar indicando un proceso de senescencia, similar al observado en las curvas de crecimiento de las plantas *in vitro*, cuando estas superan las 10 semanas de cultivo (Figura 8).

El hecho de que algunos de los microtubérculos de las plántulas de *D. alata* germinaran y formaran plantas vigorosas, demuestra el potencial que varios investigadores han observado en torno a la producción de este tipo de estructura en esta especie, con el fin de que estos, en lugar de las plántulas aclimatizadas, sirvan como “semilla”. Esto facilitaría el manejo a la hora de llevar

el material micropropagado al campo, y posiblemente haría el proceso más accesible a pequeños y medianos productores, que no cuentan con la infraestructura necesaria para el establecimiento en el campo de las plantas obtenidas *in vitro* (John *et al.* 1993, Jean y Cappadocia 1991).

Efecto de la humedad

El incremento observado en la sobrevivencia de las plántulas de *Dioscorea*, cuando estas fueron colocadas en el túnel de polietileno, demuestra la importancia del manejo de la humedad durante la fase de aclimatización (Figura 10). Esto coincide con lo expuesto por Preece y Sutter (1990), quienes mencionan que una de las principales causas de la muerte de las plántulas micropropagadas al ser transferidas *ex vitro*, se deriva del estrés producido al cambiarlas de una atmósfera saturada de agua ($\approx 100\%$ HR) permanentemente a una en la que la humedad relativa es variable y sustancialmente menor.

El túnel de polietileno logra que la sobrevivencia de las plántulas se incremente, debido a que hace que el cambio en la humedad relativa ocurra de una forma gradual, mientras las plántulas logran desarrollar los mecanismos para la regulación del intercambio gaseoso y la transpiración.

El tiempo óptimo de permanencia de las plántulas en el túnel dependerá del tiempo que estas requieran para desarrollar estos mecanismos, los cuales involucran cambios a nivel morfológico y fisiológico, necesarios para que las plántulas logren adaptarse al ambiente externo. Entre estos cambios se destaca, como los más importantes: la deposición de cera epicuticular; el engrosamiento de la capa de células de empalizada; las activación de la función estomática; la lignificación de los tejidos; el desarrollo de la conexión vascular tallo-raíces que permita un adecuado balance hídrico de las plántulas; y la activación de la función fotosintética (Pierik 1987, Preece y Sutter 1990).

Los resultados obtenidos, tanto para la sobrevivencia de las plántulas como para su crecimiento, demostraron que en *D. trifida*,

un tiempo de 2-3 semanas de permanencia en el túnel de polietileno es óptimo para lograr resultados positivos en el proceso de aclimatización. En *D. alata*, el tiempo de permanencia (considerando la sobrevivencia, el incremento en peso y el incremento en número de hojas) debe ser de 4 semanas. Asemota *et al.* (1997), en un ensayo sobre aclimatización de ñame concluyeron, en función de la tasa de crecimiento de las plántulas y de los niveles de invertasa y peroxidasa (enzimas relacionadas con el proceso de crecimiento), que el proceso de endurecimiento de *Dioscorea* spp. es de aproximadamente 4 semanas.

Efecto del antitranspirante

El hecho de que el tratamiento de las plántulas con el antitranspirante PrimaFresh, no hubiera tenido efecto positivo sobre su aclimatización, fue contrario a lo esperado, si se considera que la cera vendría a contrarrestar los efectos negativos derivados de la deposición deficiente de cera epicuticular en las vitroplantas. Este resultado apoya lo mencionado por Preece y Sutter (1990), acerca de la variabilidad de resultados que se ha tenido con el uso de antitranspirantes como técnica para la aclimatización de plántulas micropropagadas.

En resumen, las variables edad del cultivo y permanencia de las plantas en el túnel de aclimatización demostraron ser importantes para optimizar la sobrevivencia de las plántulas de ñame y yampí micropropagadas. Las plántulas deben ser trasplantadas al invernadero entre la cuarta y la séptima semana de cultivo, cuando presenten para el caso de *D. alata* de 2-4 hojas y un peso fresco de 100-300 g planta⁻¹ y de 1-2 hojas y un peso fresco de 100-200 g planta⁻¹, en el caso de *D. trifida*. Las plántulas de *D. trifida* deben permanecer en el túnel de polietileno por 2-3 semanas después de ser removidas del cultivo *in vitro*, mientras que las de *D. alata* 4 semanas. Estas

condiciones de manejo permiten asegurar una sobrevivencia mayor al 95%.

El paclobutrazol no tuvo efectos positivos en el proceso de aclimatización de plántulas de *Dioscorea*; sin embargo, a ciertas dosis promovió el crecimiento de las mismas durante las fase III de cultivo *in vitro*. Se podría evaluar la posibilidad de utilizar el paclobutrazol durante la micropropagación de *Dioscorea*, con el fin de obtener tasas de crecimiento y multiplicación mayores. Así mismo, es importante conocer cual es el efecto sobre el desarrollo posterior (incluyendo la fase de campo) del uso de este retardador de crecimiento.

LITERATURA CITADA

- AMMIRATO P. 1984. Yams, pp. 327-354. *In*: D. Evans, P. Shalp, P. Ammirato, Y. Yamada. (eds). Handbook of plant cell culture. Vol.3. Macmillan. New York, USA.
- ARTECA R. 1996. Plant growth substances. Principles and applications. Chapman and Hall. New York, USA. 331 p.
- ASEMOTA H., IYARE O., WHEATLEY A., AHMAD M. 1997. Acclimatization of *in vitro* grown yam (*Dioscorea* spp.) plantlets and some enzyme changes. Tropical Agriculture (Trinidad) 74(3): 243-247.
- CHACON G. 1999. Preacondicionamiento *in vitro* y aclimatización de plantas de ñame (*Dioscorea trifida* y *D. alata*). Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 72 p.
- CHACON G., SABORIO F., GOMEZ L., TORRES S., VALVERDE R. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Costarricense 24(2):57-62.
- DAVIS T., CURRY E. 1991. Chemical regulation of vegetative growth. Critical Reviews in Plant Sciences 10(2): 151-188.
- DÍAZ-PÉREZ J., SHACKEL K., SUTTER E. 1995. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. Journal of American Society of Horticultural Science 120(3): 435-440.
- FORSYTH C., VAN STANDEN J. 1982. An improved method of *in vitro* propagation of *Dioscorea bulbifera*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 1: 275-281.
- GAO J., HOFSTRA G., FLETCHER R. 1988. Anatomical changes induced by triazoles in wheat seedlings. Canadian Journal of Botany 66: 1178-1185.
- HENDERSON K., TAJI A., WILLIAMS R. 1993. Effects of reduced humidity and paclobutrazol on acclimatization of tissue-cultured plants. Combined Proceedings International Plant Propagator's Society 43: 97-102.
- HUYLENBROECK J., DEBERGH P. 1996. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2(3): 136-141.
- JEAN M., CAPPADOCIA C. 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo Fuerte' and 'Florido' and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell Tissue and Organ Culture 26:147-152.
- JOHN J., COURNEY W., DECOUTEAU D. 1993. The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *D. alata* L. cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture 34: 245-252.
- LEON J. 1978. Botánica de los cultivos tropicales. IICA. San José, Costa Rica. 455 p.
- MURALI T., DUNCAN E. 1995. The effects of *in vitro* hardening using triazoles on growth and acclimatization of banana. Scientia Horticulturae 64: 243-251.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- PIERIK R. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff. Dordrecht, Netherlands. 344 p.
- PREECE J., SUTTER E. 1990. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, pp.71-94. *In*: P. Debergh, and R. Zimmerman (eds). Micropropagation technology and application. Kluwer. Dordrecht, Netherlands.
- PROCOMER. 2005. Datos de comercio exterior. Información en línea. www.procomer.com.
- SMITH E., ROBERTS A., MOTTLEY J., DENNESS S. 1991. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil, the effects of eleven growth retardants on wilting. Plant Cell Tissue and Organ Culture 27: 309-313.

- TORRES J., MOGOLLÓN N. 2002. Efecto del PBZ sobre la brotación y el desarrollo *in vitro* de la epidermis de *Cattleya mossiae* parker ex hooker previo a la aclimatización. Bioagro 14(1): 25-28.
- VOYIATZIS D., McGRANAHAM M. 1994. An improved method for acclimatizing tissue-cultured walnut plantlets using an antitranspirant. HortScience 29(1):42.
- ZIV M. 1990. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants, pp. 45-70. In: P. Debergh, and R. Zimmerman (eds). Micropropagation technology and application Kluwer. Dordrecht, Netherlands.