



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA**

**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA  
VITROPROPAGACIÓN DE *Vanilla planifolia***

*G. Jackson*

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA**

**PRESENTA**

**MITZY TIARE ARENAS SANTOS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. DELFINO REYES LÓPEZ**

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre 2019



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA**

**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA  
VITROPROPAGACIÓN DE *Vanilla planifolia***

*G. Jackson*

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA**

**PRESENTA  
MITZY TIARE ARENAS SANTOS**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. DELFINO REYES LÓPEZ**

**ASESORES  
DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES  
DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ**

**San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre 2019**

La presente tesis titulada: Optimización de un medio de cultivo para la vitropropagación de *Vanilla planifolia* G. Jackson y realizada por Mitzy Tiare Arenas Santos, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el Título de:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

Facultad de Ingeniería Agrohidráulica

Consejo Particular integrado por:

Firma


Director: Dr. Delfino Reyes López



Asesor: Dr. Luis Antonio Domínguez Perales



Asesor: Dra. Carmela Hernández Domínguez



San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre de 2019

El presente trabajo forma parte del Grupo de Investigación denominado: **Agrobiotecnología y recursos naturales** y de la Línea de Investigación: **Biotecnología, conservación y protección vegetal**. Dicho trabajo, fue financiado con recursos propios.

## DEDICATORIA

**¡Ya estamos aquí!** lo logre y nada me hace más feliz que saber que ustedes lograron verlo, esta tesis está dedicada a ustedes, mi adorada familia, los amo infinitamente y les agradezco por mantenerse a mi lado siempre, apoyándome, dándome palabras de aliento, enseñándome a no rendirme y demostrarme que aun contra las adversidades que llegaran a presentarse, se podía seguir adelante.

Gracias a todos por enseñarme que aun con y sin recursos, si se quiere salir adelante, se puede. Gracias por apoyarme en todas mis decisiones, por nunca desanimarme en esto y por darme su paciencia.

Tuvimos problemas y hubo momentos en los que no sabíamos cómo salir de ellos, muchas veces hubo enfermedades, en otras ocasiones nos desesperamos... y aun así puedo decir orgullosa que logramos salir.

Gracias por nunca frenar mis deseos de aprender.

Maxim espero que cuando leas esto te sirva de algo, te logre alentar a ser el mejor, yo sé que puedes hacer cosas maravillosas, así que no te rindas, y espero esta tesis te motive de alguna manera.

Hay tantas cosas que quiero decir, que una sola hoja no alcanzaría, pero en su momento, todo lo sabrán.

Andres... Missa... esto también va por ustedes chicos, gracias por hacer tan disfrutable mi estadía en Teziutlán y mi carrera de licenciatura, ustedes fueron mis compañeros, mis amigos y un hogar. Lograron hacer que el hecho de estar lejos de casa y mi familia no fuera tan desolador. Me abrieron las puertas de sus casas y ahora ustedes se quedarán de por vida en mi corazón. Los amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al doctor Delfino quien me ofreció su entera confianza para la realización de esta tesis al mismo tiempo que continuamente me incito a investigar, retroalimentarme y experimentar. Gracias a usted me llevo conocimientos nuevos y unas infinitas ganas de seguir adelante

A la doctora Carmela quien con su experiencia enriqueció este trabajo al hacer comentarios precisos, apoyándome en lo necesario.

Al doctor Luis Antonio que me apoyo en diversos aspectos del área *in vitro*.

A INIFAP-COYOACAN que por cuatro meses me acogió y me enseñó los conceptos básicos de reproducción *in vitro*.

A la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica por haber sido un hogar para mi durante todo este tiempo.

## ÍNDICE GENERAL

---

CONTENIDO	PAGINA
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
4.1. Generalidades de la vainilla .....	5
4.2. Descripción morfológica de la vainilla .....	7
4.2.1. Tallo .....	7
4.2.2. Hojas .....	7
4.2.3. Inflorescencias .....	7
4.2.4. Frutos .....	8
4.2.5. Raíces .....	8
4.2.6. Requerimientos de la vainilla .....	8
4.3. Generalidades de la reproducción <i>in vitro</i> .....	9
4.4. Etapas de propagación <i>in vitro</i> .....	11
4.4.1 Selección y preparación de la planta madre .....	11
4.4.2 Desinfección de las yemas de la planta y semillas .....	11
4.4.3 Procesamiento de los explantes .....	11
4.4.4 Siembra de explantes .....	12
4.4.5 Resiembras, individualización de brotes y enraizamiento .....	12
4.4.6 Monitoreo .....	12

4.5. Reproducción <i>in vitro</i> en vainilla .....	12
4.6. Contaminación de explantes de campo en vitroreproducción de vainilla .....	14
<b>V. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>16</b>
5.1. Localización del sitio experimental .....	16
5.2. Material biológico utilizado.....	16
5.3. Medios de cultivo, desinfección y siembra de explantes provenientes de campo.....	17
5.3.1. Preparación de medios de cultivo .....	17
5.3.2. Proceso de desinfección de explantes.....	22
5.3.3. Siembra de explantes .....	26
5.4. Medios de cultivo y siembra de explantes provenientes de subcultivos de <i>V. planifolia</i> G. <i>Jackson</i> .....	27
5.4.1. Preparación de medio de cultivos para la siembra de subcultivos .....	27
5.4.2. Proceso de siembra de subcultivos .....	28
5.5. Distribución de tratamientos y análisis estadístico.....	28
5.6. Variables evaluadas .....	28
5.6.1. Días de viabilidad de la planta.....	28
5.6.2. Oxidación en los explantes .....	29
5.6.3. Presencia de contaminación.....	29
5.6.4. Presencia de oxidación – contaminación.....	29
5.6.5. Días a la brotación .....	29
5.6.6. Estimación de la longitud del rebrote .....	29
5.6.7. Numero de hojas.....	29
5.6.8. Longitud de raíces .....	29
5.7. Análisis estadístico .....	29

<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>30</b>
6.1. Problemas de contaminación y oxidación .....	30
6.2. Medios de cultivo, desinfección y siembras de explantes provenientes de campo .....	32
6.3. Reproducción <i>in vitro</i> de subcultivos en <i>V. planifolia</i> G. Jackson.....	43
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
<b>Figura 1.</b> Ubicación del laboratorio de cultivo de tejidos. ....	16
<b>Figura 2.</b> Numero de explantes contaminados, oxidados, contaminados-oxidados y viables. ....	30
<b>Figura 3.</b> Izquierda (A): explante sano; centro (B) explante con tonalidad canela; derecha (C): explante con necrosis. ....	31
<b>Figura 4.</b> Izquierda (A): presencia de micelio blanco en la base del explante; centro (B) contaminación en el área de las raíces adventicias; derecha (C): contaminación en el corte aéreo del explante. ....	32

## ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
<b>Cuadro 1.</b> Cantidad de MS y sacarosa usado en medios de cultivo. ....	17
<b>Cuadro 2.</b> Medios de cultivo modificados de MS. ....	19
<b>Cuadro 3.</b> Cantidad de sales minerales para la realización de MS modificado. ..	20
<b>Cuadro 4.</b> Desinfección, medios utilizados y resultados de reproducción <i>in vitro</i> en <i>V. planifolia</i> G. Jackson. ....	34
<b>Cuadro 5.</b> Periodo de vida de explantes de <i>V. planifolia</i> G. Jackson y muerte por oxidación. ....	40
<b>Cuadro 6.</b> Periodo de vida de explantes de <i>V. planifolia</i> G. Jackson y muerte por contaminación. ....	40
<b>Cuadro 7.</b> Periodo de vida de explantes de <i>V. planifolia</i> G. Jackson al incluir 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo. ....	41
<b>Cuadro 8.</b> Periodo de vida de los explantes <i>V. planifolia</i> G. Jackson considerando diferentes concentraciones de MS. ....	43
<b>Cuadro 9.</b> Desarrollo de subcultivos de explantes de <i>V. planifolia</i> G. Jackson. ....	44

## RESUMEN

La reproducción in vitro se utiliza de manera exitosa para la conservación ex situ de especies, así como la reproducción y mejoramiento genético de diversos cultivos. Sin embargo, los medios de cultivo utilizados varían según la especie o variedad usada. Con el objetivo de desarrollar un protocolo de desinfección de explantes y preparación de medio de cultivo MS para la vitropropagación de explantes provenientes de campo y de subcultivos de *Vanilla planifolia* G. Jackson, que resuelvan el problema de contaminación y oxidación de los explantes provenientes de campo, se llevaron a cabo seis siembras en diferentes medios de cultivos con concentraciones del 100, 70, 40 y 10 % tanto de Murashige & Skoog (MS) como de sacarosa adicionados con agua de coco. Así mismo, para la siembra de subcultivos se modificó el MS, la sacarosa y se le adicciono al medio agua de coco. Los procesos de desinfección consistieron en probar diferentes concentraciones y tiempos de exposición al cloro, bicloruro de mercurio y alcohol. Los resultados indicaron que el tratamiento al 40 % de MS retardo por más tiempo la aparición de hongos contaminantes en el medio de cultivo y el agua de coco al incluirse en los medios de cultivo presento efectos positivos ( $p \leq 0.05$ ), influyendo principalmente en la formación de raíces. Así mismo, se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) al reducir la concentración de cloro al 0.25 % y un tiempo de exposición de 5 segundos, el bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) en una concentración del 0.025 % por 10 segundos y el alcohol a un periodo de inmersión de 5 segundos con una concentración al 50 %.

**Palabras clave:** *Vanilla planifolia*, protocolo de desinfección, micropropagacion, conservación ex situ.

## ABSTRACT

In vitro breeding is successfully used for ex situ conservation of species, as well as the breeding and genetic improvement of various crops. However, the culture media used vary according to the species or variety used. In order to develop a protocol for the disinfection of explants and preparation of MS medium for the vitropropagation of field explants and subcultures of *Vanilla planifolia* G. Jackson, which solves the problem of contamination and oxidation of field-grown explants, six sowings were made in different culture medium with concentrations of 100, 70, 40 and 10 % of both Murashige & Skoog (MS) and saccharose added with coconut water. Likewise, for the sowing of subcultives, the MS and sucrose were modified and the medium was added with coconut water. The disinfection processes consisted of testing different concentrations and exposure times to chlorine, mercury bichloride and alcohol. The results indicated that treatment at 40 % MS delayed the appearance of contaminating fungi in the growing medium and coconut water when included in the growing medium had positive effects ( $p \leq 0.05$ ), influencing mainly on root formations. Also there were statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) when the chlorine concentration was reduced to 0.25 % with an exposure time of 5 seconds, the mercury bichloride ( $HgCl_2$ ) in a concentration of 0.025 % per 10 seconds and the alcohol on an immersion period of 5 seconds with a concentration of 50 %.

**Keywords:** *Vanilla planifolia*, disinfection protocol, micropropagation, ex situ conservation

## I. INTRODUCCIÓN

Según Gamboa (2014), la vainilla es una planta aromática que posee la particularidad de ser la única especie comestible de la familia *Orchidaceae*. El género *Vanilla* comprende más de 110 especies que se desarrollan en las áreas tropicales del mundo. De las 15 especies de vainillas mesoamericanas, únicamente diez especies se encuentran en México, todas ellas cercanamente emparentadas: *Vanilla. cribbiana*, *Vanilla hartii*, *Vanilla helleri*, *Vanilla inodora*, *Vanilla insignis*, *Vanilla perplexa*, *Vanilla odorata*, *Vanilla phaeantha*, *Vanilla pompona* y *Vanilla planifolia* (Soto, 1989).

Algunas especies del género *Vanilla* tienen importancia económica, siendo la segunda especie más costosa, después del azafrán, y el aromatizante más utilizado en la industria alimenticia (Havkin *et al.*, 2011). El constituyente principal de la vainilla es la vainillina, la cual se utiliza como constituyente principal de productos cosméticos y en las preparaciones de medicamentos; se utiliza como aditivo de fotoestabilización, con el fin de evitar la degradación de los medicamentos. La aplicación de la vainillina y de sus derivados en un material plástico para contrarrestar los rayos UV ya fue patentada y parece prometedora para la industria de los envases, así como para los cosméticos y productos como cremas solares (Tai *et al.*, 2011).

La vainilla, al igual que muchos otros recursos naturales de México, es sobreexplotada y subutilizada, por lo cual, las poblaciones silvestres han sido diezmadas con la colecta excesiva para el establecimiento de plantaciones hasta el punto de que la especie está en severo peligro de extinción (Soto, 2006). En este sentido, *Vanilla planifolia* es la única de su género en estar catalogada como en protección especial dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010, es muy probable que las demás especies se encuentran en igual o mayor peligro de desaparecer. Debido a factores como, la destrucción de su hábitat, el cambio de uso de suelo, su compleja biología reproductiva (como la de todas las orquídeas) y la colecta y saqueo de ejemplares silvestres de su hábitat, afectan directamente a las poblaciones de estas especies, contribuyendo a su desaparición (Cibrián, 2013). Según FAO (1995), a nivel mundial *V. planifolia* se encuentra enlistada en la categoría de alto grado de erosión genética, entendida como la pérdida de materia prima para el futuro mejoramiento genético de las plantas, por lo que es importante el rescate y la conservación del material de vainilla existente, así como de las especies silvestres cercanas, además de la generación de diversidad genética mediante la hibridación interespecífica (Soto, 1999).

Otro problema que presenta la vainilla es el escaso número de insectos polinizadores, que se han reducido por la aplicación de plaguicidas, por lo que cada flor tiene que ser autopolinizada manualmente para formar un fruto, lo que implica una mayor inversión en mano de obra para el cultivo (Coro, 2009). Por otro lado, el manejo en los cultivos con la aplicación de agroquímicos, ha dañado los ciclos naturales y las interacciones favorables para la reproducción natural de la vainilla, por ejemplo, los fungicidas han perturbado la asociación entre hongos micorrízicos benéficos nativos que son necesarios para la germinación, por lo tanto, la germinación de la vainilla es extremadamente rara de observarse en el campo (Soto, 2006).

Como las probabilidades de conservación *in situ* son muy remotas debido a la gran dispersión de estos especímenes en cuatro estados del país y al hecho de que ningún área protegida tiene, hasta donde se sabe, más de cinco clones, se necesita una estrategia de conservación *ex situ*, en bancos de germoplasma (Soto, 2003).

La reproducción *in vitro* es una técnica que se ha utilizado de manera exitosa para la conservación *ex situ* de diversas especies, así como la reproducción y mejoramiento genético de diversos cultivos (Castillo 2015). Sin embargo, los medios de cultivo utilizados varían según la especie o variedad usada.

En relación a la vainilla, se han reportado diversos trabajos de reproducción *in vitro*, tales como los de Bello et al. (2015) o los de Spinoso (2013). Sin embargo, en la mayoría de dichos trabajos, las metodologías de desinfección mencionadas, sobre todo cuando el material proviene de campo, así como las cantidades de reactivos usados en los medios de cultivo, al ser llevadas a la práctica, generan efectos adversos en los explantes de *Vanilla planifolia* G. Jackson.

La oxidación y contaminación debido a la presencia de microorganismos tanto endógenos como exógenos en los explantes de vainilla constituyen en el principal problema en la reproducción *in vitro* de esta especie, por lo que el objetivo del presente trabajo fue optimizar un medio de cultivo, así como establecer una metodología de desinfección de explantes provenientes de campo y de subcultivos adecuada para la vitropropagación de *Vanilla planifolia* G. Jackson.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo de desinfección de explantes y preparación de medio de cultivo MS para la vitropropagación de explantes provenientes de campo y de subcultivos de *Vainilla planifolia* G. Jackson.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar la eficiencia de un medio de cultivo preparado en concentraciones del 100%, 70%, 40% y 10% de sacarosa y las sales Murashige & Skoog (MS)
- Probar el efecto del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH (Triofanato metílico), anexado dentro del medio MS preparado.
- Probar el efecto del HgCl<sub>2</sub>, cloro y alcohol a diferentes concentraciones en el tren de desinfección de explantes de *Vainilla planifolia* G. Jackson provenientes de campo.
- Establecer un protocolo de desinfección que no afecte la viabilidad de los explantes a utilizar.

### III. HIPÓTESIS

Los explantes de *Vanilla planifolia* G. Jackson sembrados en medios de cultivo *in vitro* preparados con dosis del 40% de Murashige & Skoog (MS), sacarosa un fungicida sistémico y desinfectados con dosis de 0.025% de bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) y 0.30% de cloro comercial, permitirán el desarrollo adecuado de plantas *in vitro* de vainilla con índices bajos de contaminación y oxidación.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Generalidades de la vainilla

La vainilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) es una orquídea que produce frutos aromáticos comestibles, lo que la posiciona como uno de los legados agro biológicos más trascendentales de las culturas de Mesoamérica (Lubinsky *et al.*, 2008)

En los ámbitos cultural, biológico y económico, la vainilla es uno de los cultivos, que se ha convertido en el aromatizante más popular utilizado en el arte culinario de repostería y elaboración de helados, así como en la industria refresquera, vinícola, tabacalera, y de perfumería, entre otras (Brownell, 2006), por lo que se considera como uno de los productos agrícolas con mayor valor comercial del mundo.

El género *Vanilla* comprende plantas tropicales de hábito hemiepífito con características variables dentro del género, considerado un grupo diverso comparado con otros géneros de orquídeas. Generalmente todas las especies del género *Vanilla* poseen tallo cilíndrico, verde y carnoso que crece adherido a los troncos de los árboles mediante raíces adventicias con hojas alternadas y planas (Soto y Cribb, 2010).

Jiménez (1990) describe a la vainilla (*Vanilla planifolia*) como una orquídea originaria de los bosques tropicales de México, América Central, las Antillas y algunos países de América del Sur. Así mismo Moreno y Díez (2011) la describen como una orquídea tropical altamente promisoría para ser cultivada en las tierras bajas y valles interandinos de Suramérica tropical.

El uso de la vainilla se familiarizó durante la conquista de México por los españoles, la planta fue extendida por todo el mundo y ahora se cultiva en regiones tropicales como Madagascar, Papua, Nueva Guinea, Uganda, Indonesia, India, Tahití / Islas Comores, Mayotte, Isla La Reunión y México (Dunphy y Bala, 2010). La demanda de vainilla se ha incrementado en 15 países que incluyen integrantes del TLCAN, el TPP y el TLCTN, así como del bloque de la unión europea y otros con los que México no tiene tratados de libre comercio (SAGARPA, 2017).

En el contexto productivo, en México, en el periodo del 2003 al 2016, la producción de vainilla aumento casi el doble, para ubicarse en un total de 512 toneladas en 2016, debido al aumento del rendimiento promedio nacional de 71.07% en el mismo periodo, de las 1059 hectáreas sembradas en 2016, el 38.55% de la superficie se encuentra mecanizada, 54.23%

del territorio sembrado con este cultivo con asistencia técnica. Por otro lado, 99.99% de la producción se realiza bajo condiciones de temporal (SAGARPA, 2017)

El hábitat más característico de *V. planifolia* son las selvas medianas perennifolias y subperennifolias, también se reporta en selvas contiguas a sabanas inundables. El principal productor de vainilla en México es el estado de Veracruz, que aporta 70% de la producción nacional. Le siguen, en orden de importancia, Oaxaca y Puebla, San Luis Potosí, Hidalgo, Chiapas y Quintana Roo que en conjunto aportan 30% de la producción total. En Veracruz *V. planifolia* se cultiva principalmente en los municipios de Papantla, Tuxpan, Misantla Gutiérrez Zamora y San Rafael (Herrera *et al.*, 2012).

El cultivo tradicional de la vainilla se realiza a partir de segmentos cortados de tallo (clones), ocasionando que no se presente variación genética entre individuos, esta práctica ha causado que las plantaciones sean susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, en particular por la pudrición de la raíz causada por *Fusarium batatis* y la antracnosis causada por *Calospora vanillae* (Divakaran *et al.*, 2006).

La vainilla como todas las orquídeas es una especie que depende de la interacción con otros organismos para su desarrollo, dependiendo de árboles soporte o tutores, en los que se apoya como enredadera, una vez en floración, depende de insectos específicos para su polinización e incluso cuando los frutos maduran, se ha mencionado también que son ingeridos por especies de murciélagos, quienes ayudan a degradar la cubierta de las semillas completando el ciclo de vida (Lozano, 2014).

Se ha demostrado que existe una gran diversidad de hongos endófitos no formadores de micorriza asociados con las raíces y partes aéreas de orquídeas de vainilla, resaltando el papel que cumplen estos microorganismos en la protección de la planta frente a ataques de patógenos, ya sea por la síntesis de metabolitos secundarios o por el mejoramiento en la nutrición a través de la disponibilidad de los nutrientes (Ordóez *et al.*, 2012).

Debido a su origen clonal y a su propagación vegetativa, la vainilla cultivada presenta una base genética estrecha, lo que la convierte en una especie susceptible a un gran número de enfermedades causadas principalmente por patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. y *Phytophthora sp* (Adame *et al.*, 2011).

## **4.2. Descripción morfológica de la vainilla**

### **4.2.1. Tallo**

Es una planta perenne, siendo un bejuco, de tallo monopódico, verde, fotosintéticamente activo, suculento, cilíndrico y sarmentoso, formado por entrenudos de 10 a 15 cm de largo y de 10 a 15 mm de diámetro. La altura que puede alcanzar esta planta trepadora varía de 10 a 15 metros (Alatorre, 2002).

Los tallos pueden ser simples o ramificados, de aquí es donde salen las hojas y las raíces, son grandes, suculentos, verdes y carnosos (Cordero, 1986).

### **4.2.2. Hojas**

Las hojas de las especies del género *Vanilla* varían de color verde claro a verde oscuro e incluso se presentan formas variegadas (*V. Planifolia* CV. *Acamaya*), las hojas pueden ser membranosas (*V. Inodora*), coriáceas o carnosas (*V. Planifolia*, *V. Pompona*) e incluso hay especies con ausencia total de hojas (*V. Claviculata* y *V. Humblotii*) (Menchaca, 2011).

Las hojas son enteras, planas, ovales, oblongas y terminadas en punta, son alternas paralelinerves, gruesas y cerosas de 15 a 18 cm de diámetro y de 5 a 7 cm de ancho, nacen de cada uno de los nudos del bejuco, en oposición con las raíces aéreas modificadas, son subsésiles, provistas de un peciolo corto que forma una especie de canaladura, sus nervaduras son paralelas y oscuras, se vuelven prominentes cuando la hoja se seca (González, 2013).

### **4.2.3. Inflorescencias**

Según Gamboa (2014) las vainillas representan un grupo basal en las orquídeas, sus flores muestran características florales tan complejas como las de orquídeas más avanzadas.

Las inflorescencias nacen en las axilas de las hojas en forma de racimo o panícula, las flores, presentan diversos tamaños formas y colores según la especie, en general son resupinadas y están conformadas por tres sépalos y tres pétalos, como todas las orquídeas, uno de los cuales, el pétalo central, llamado labelo, está modificado en forma de cono y se encuentra soldado a la columna en la que se encuentra el estigma y las masas de polen. Las flores presentan sépalos y pétalos de forma y tamaño variado, desde muy amplios (*V. Albida*) hasta angostos y fuertemente rizados (*V. Inodora*), el labelo puede tener ornamentaciones como en *V. Insignis*, el callo puede ser penicelado o liso (Sarukhán *et al.*, 2012).

Las flores abren secuencialmente una tras otra en la inflorescencia y son muy efímeras, permaneciendo menos de 12 horas abiertas, en algunas especies las flores son aromáticas y

muchas especies de vainillas son polinizadas por abejas euglosinas machos atraídas por compuestos químicos aromáticos (Dressler, 1993).

La coloración de las flores varía según la especie, del verde pálido a amarillo intenso pudiendo tener colores contrastantes en el labelo que pueden ser rojo (*V. Imperialis*) o púrpura (*V. Polylepis*) o bien solo los márgenes de labelo con colores diferentes (Lozano, 2014).

#### **4.2.4. Frutos**

El fruto de las especies de vainilla es una cápsula, (equivocadamente llamada vaina) que puede ser dehiscente o no, según la especie que se trate, pueden ser de corte triangular con forma semi-cilíndrica como en *V. Planifolia*, o compactos y gruesos como en *V. Pompona* con quillas laterales (SINAREFI, 2014).

#### **4.2.5. Raíces**

*Vanilla planifolia* es una especie de hábitos hemihepífitos por lo que sus raíces crecen hacia el suelo en búsqueda de nutrimentos y agua, con respecto a su fenología es perenne por lo que las hojas deben ser funcionales por largo tiempo y estas deben aportar nutrimentos y fotosintétatos (Padilla, 2016).

Las raíces adventicias son carnosas y largas, sirven a la planta para adherirse al tutor, las raíces subterráneas se llaman trazadoras ya que se extienden en un radio de hasta 8 cm, a través de ellas adquieren los nutrientes del humus del suelo (León, 1987).

#### **4.2.6. Requerimientos de la vainilla**

La vainilla se desarrolla en un clima húmedo cálido, donde las lluvias sean frecuentes, pero no excesivas; en términos generales una precipitación de 2000 mm anuales y una humedad relativa del 80% es suficiente para el adecuado desarrollo (Guerra, 1992).

La vainilla resiste desde 700 hasta 4200 mm máximo, las lluvias muy fuertes afectan la producción de flores y la maduración de las vainas (Anlew, 1974).

La temperatura media anual óptima para su crecimiento es de aproximadamente 21°C, con un promedio mínimo de temperaturas entre 7°C y 12°C, las cuales resiste por un periodo corto y un promedio máximo de 28°C a 32°C (Guerra, 1992). Por otro lado, Alatorre (2002) afirma que el cultivo puede realizarse desde el nivel del mar hasta los 600 – 800 m.s.n.m.

### 4.3. Generalidades de la reproducción *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas, se centra en cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento (Castillo, 2015).

La propagación de plantas por este sistema se conoce también como propagación clonal, ya que se obtiene la regeneración de un número indeterminado de plantas genéticamente idénticas a partir de una porción muy pequeña de la planta madre (George, 1993).

El cultivo *in vitro* aprovecha el principio de totipotencialidad celular, el cual plantea que todas las células tienen la capacidad de regenerar a un individuo completo o a partes de él, si se le proporcionan las condiciones apropiadas, ya que contienen toda la información genética necesaria para ello (Bonga y Von Aderkas, 1992)

La propagación masiva *in vitro* es una alternativa viable para especies vegetales amenazadas cuya multiplicación por métodos convencionales, ya sea por semillas o por métodos asexuales, es poco eficiente (Pence, 2011). Así mismo, otra de las ventajas de este tipo de propagaciones es la obtención de un gran número de plantas saludables y de alta calidad en un espacio reducido y en corto tiempo, independientemente de factores climáticos limitantes (Soares *et al.*, 2010).

El cultivo *in vitro* permite la conservación de material valioso a mediano plazo en bancos de germoplasma, permitiendo el intercambio de material vegetal para programas de mejoramiento genético (Carrillo *et al.*, 2011; Bello *et al.*, 2015).

Uno de los métodos más empleados para la conservación *in vitro* de algunas especies de importancia agrícola como de las células o tejidos, es prolongar los periodos entre subcultivos y disminuir los costos inherentes a la mano de obra y reactivos necesarios para la conservación de germoplasma (Bello *et al.*, 2015).

El cultivo *in vitro* es una técnica que facilita la germinación y propagación de prácticamente cualquier orquídea, ya que se lleva a cabo en condiciones de asepsia, en presencia de una fuente de nutrimentos y condiciones físicas controladas, lo que potencializa su capacidad de reproducción y crecimiento (Salazar *et al.*, 2013).

Kirakayosan y colaboradores (2011) han descrito cuatro aplicaciones de estas técnicas para la propagación de plantas, las cuales son:

- Micropropagación: en la que se promueve la elongación de brotes axilares preexistentes que están asociados a una yema apical. Abarca una serie de técnicas de cultivo en un medio estéril de distintos segmentos (explantes) de la planta, a los que se les proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas con el fin de regenerar plantas enteras. De esta forma se puede utilizar como explante el cotiledón, hipocótilo, tallo, hoja, raíz, meristemas, yemas axilares, embriones, inflorescencias, pétalos, óvulos y el polen (González, 2013).
- Organogénesis: refiriéndose a la formación de novo de yemas o raíces a partir de un tejido, que es directa si se forma sobre el explante o indirecta si los órganos se forman a partir del cultivo de masas de células indiferenciadas conocidas como cayos (Kirakayosan *et al.*, 2011).
- Embriogénesis: que implica la formación de embriones a partir de tejido somático, es decir, sin que haya ocurrido un proceso de fertilización (INIFAP, 2013).
- Cultivo y fusión de protoplastos: en el que se usan células a las que se les ha eliminado la pared celular, lo cual facilita la producción de híbridos y la manipulación genética (Loloya *et al.*, 2006)

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas (Castillo, 2015).

Así mismo, un cultivo *in vitro* puede presentar contaminación de tejidos, originados de dos fuentes fundamentales: una llevada a cabo por microorganismos en la superficie o en los tejidos de los explantes, o por deficiencias en la manipulación de los operadores en los laboratorios (EcuRed, 2017).

Es por eso que, el desarrollo de protocolos lleva a toda una investigación en la que se obtengan bajos porcentajes de contaminación, oxidación y alto crecimiento del material en estudio (Sharma, 2012).

#### **4.4. Etapas de propagación *in vitro***

##### **4.4.1 Selección y preparación de la planta madre**

Para llevar a cabo el establecimiento de explantes, se recomienda utilizar los tejidos más jóvenes que se puedan encontrar en la planta adulta: yemas apicales y axilares, hojas muy jóvenes (Sharma, 2012).

Para usar explantes a partir de plantas maduras es conveniente que provengan de plantas vigorosas, con una buena hidratación aparente del follaje y que no muestren síntomas de contaminación por patógenos como hongos, bacterias o ataque de insectos; así mismo, se debe evitar seleccionar tejidos a partir de brotes de tallos jóvenes en los que sea evidente la dominancia apical (INIFAP, 2013).

##### **4.4.2 Desinfección de las yemas de la planta y semillas**

El material vegetal debe ser sometido a un tratamiento de desinfección para evitar el crecimiento de bacterias y hongos que pudiesen interferir en el crecimiento del tejido. El proceso implica el uso de distintos desinfectantes de manera secuencial, para lo cual todas las soluciones deben ser preparadas con agua estéril y realizarse en condiciones de asepsia.

Debido a que los tejidos deben ser sumergidos totalmente en las soluciones, es recomendable medir la cantidad necesaria a utilizar, para preparar suficiente solución desinfectante y no interrumpir el proceso una vez iniciado (Sharma, 2012).

Se sugiere lavar con jabón abundante los segmentos de tallo con movimientos suaves y repetir al menos tres veces para cada segmento, posteriormente el tejido deberá ser en una solución antioxidante en un frasco nuevo ya que el tejido debe permanecer hidratado todo el tiempo (INIFAP, 2013).

Pasado esto, se le pueden dar a la planta tratamientos de desinfección con etanol al 70%, hipoclorito de sodio, fungicida, bicloruro de mercurio o inclusive pueden usarse todos los tratamientos descritos (Azofeifa *et al.*, 2014).

##### **4.4.3 Procesamiento de los explantes**

Una vez limpios los explantes, todos deben ser llevados al cuarto de cultivo para evitar salir durante la siembra, asegurándose de que todo el material se encuentra dispuesto dentro del área de la campana de flujo laminar (Gonzales, 2013).

Dentro de la campana previamente estéril, se disectan las yemas, procurando sembrarlas inmediatamente para no perder la viabilidad del tejido, cortando la base de la hoja que

permanecen unidas al tallo principal sin afectarlo con los cortes, seguido a esto se corta la yema apical y subsecuentemente trozos de tallo de 2 cm, que incluyan al nudo y las yemas (Sharma, 2012).

#### **4.4.4 Siembra de explantes**

Se toma el explante con las pinzas estériles y se coloca en forma vertical cuidando siempre colocar la porción apical del tallo por encima del nivel del medio de cultivo. El explante deberá colocarse sobre el medio de cultivo, ejerciendo una ligera presión y procurando no tocarlo con las pinzas. El explante debe penetrar en el medio al menos a la mitad de su extensión y una vez sembrado los frascos deberán ser sellados con Egapac® o Parafilm®. Dependiendo de la especie y el medio, el desarrollo de yemas axilares se puede obtener en un periodo entre 3 y 4 semanas (Tan *et al.*, 2011).

#### **4.4.5 Resiembras, individualización de brotes y enraizamiento**

Los medios de cultivo con el tiempo se deshidratan debido al consumo de nutrimentos por parte de los explantes, es por eso que es importante realizar resiembras periódicas de los explantes en un medio nuevo. Así mismo, a medida que se alarguen las yemas axilares, estas deberán ser individualizadas y sembradas en medios para promover su enraizamiento. Es común que el medio de resiembras tenga un contenido nutrimental y hormonal diferente al medio inicial (Azofeifa *et al.*, 2014).

#### **4.4.6 Monitoreo**

Es recomendable llevar una bitácora con las anotaciones de seguimiento del desarrollo *in vitro*. Los explantes deberán ser revisados de manera diaria para detectar de manera oportuna la presencia de agentes contaminantes. Más adelante, las revisiones pueden realizarse de manera quincenal o mensual para evitar supervivencia y contaminación, así como para detectar los individuos y tratamientos con los mejores resultados (Sharma, 2012).

#### **4.5. Reproducción *in vitro* en vainilla**

En los últimos años el cultivo *in vitro* ha constituido una alternativa para la producción de plantas de vainilla a través de la micropropagación, lo que ha beneficiado a los productores de este cultivo, ya que una limitante del cultivo es la obtención de material vegetativo con características de alta productividad; aun así, se buscan nuevas tecnologías que permitan la automatización y mejoren los protocolos para la aclimatización de las plantas (Gonzales, 2013).

El cultivo *in vitro* ha permitido que especies raras y difíciles de propagar sexualmente como *Vainilla inodora*, *Vainilla insignis*, *Vainilla planifolia*, *Vainilla pompona*; progresen significativamente, incrementando así el germoplasma de éstas especies (Lozano, 2014).

El mejoramiento genético convencional de la vainilla se ha visto limitado debido a que la producción de híbridos no ha permitido obtener la resistencia esperada (Dequaire, 1976). De igual forma, los métodos de control químico y biológico no han resultado eficientes para disminuir la presencia del hongo *Fusarium* (Navarro y Perea 1996).

En *V. planifolia* se han establecido diversos protocolos de conservación *in vitro*. Divakaran et al. (2006) lograron conservar brotes *in vitro* con medio de cultivo MS suplementado con 15 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y manitol.

La transformación genética, mediante el bombardeo de micropartículas en combinación con las técnicas de cultivo de tejidos, constituyen una alternativa prometedora para la incorporación de genes de resistencia a *Fusarium*, debido al hecho de que el mejoramiento genético convencional es muy limitado y la propagación sexual es difícil en condiciones naturales (Parra 1987).

Malabadi y Nataraja (2007) realizaron pruebas de transformación genética con PLBs ("Protocorm Like Bodies") de cultivos *in vitro* de *V. planifolia*, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo de transformación. Estos autores informaron que el plásmido utilizado se integró eficientemente en los explantes de vainilla, obteniéndose posteriormente plantas transformadas genéticamente.

Así mismo, Bello et al. (2015) estableció un método para la conservación *in vitro* de *V. planifolia* basado en la adición de ABA (3 mg L<sup>-1</sup>) permitiendo mantener un banco de germoplasma *in vitro* con 90 % de viabilidad con subcultivos cada 180 días.

La producción de raíces *in vitro* de *V. planifolia* se ha llevado a cabo utilizando el protocolo de vainilla establecido por Philip y Nainar (1988) con modificaciones y optimizado mediante el empleo de un medio líquido en agitación para acelerar la rizogénesis.

Kuan y Ospina (1990) indican que cuando se trabaja en un medio líquido en agitación hay una mayor homogenización de las sustancias que componen el medio de cultivo, permitiendo una absorción más rápida de los nutrientes por parte del explante.

Se reporta que la aplicación de 50 mg L<sup>-1</sup> AgNPs (2,5 mg L<sup>-1</sup> concentración de plata metálica) fue la concentración más adecuada para reducir la contaminación bacteriana e

inducir una respuesta hormética en el crecimiento y la diferenciación en el cultivo de tejidos vegetales de vainilla, además se indica la concentración de AgNPs ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de plata metálica) con polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizante (Spinoso *et al.*, 2013).

#### **4.6. Contaminación de explantes de campo en vitroreproducción de vainilla**

La vainilla como todas las orquídeas es una especie que depende de la interacción con otros organismos para su desarrollo, por ejemplo, desde el inicio de su vida depende de hongos endófitos que se asocien con su semilla y le permitan germinar, una vez que germina (Lozano, 2014).

La presencia de actividad  $\beta$ -glucuronidasa endógena en materiales *in vitro* de vainilla, demuestran que, las terminales radicales a las 2 semanas posteriores al bombardeo se vieron afectada por la presencia de hongos, oxidación y una exudación blancuzca en la base de los explantes (Gätjens y Montero, 2012).

Según Lana *et al.* (2011) los problemas debidos a la contaminación con hongos del género *Rizoctonia* y *Alternaria* en los explantes han sido la principal limitante en las respuestas *in vitro* de Vainilla.

En general las técnicas de micropropagación que se utilizan para orquídeas es empleando medio semisólido (George *et al.*, 2008).

Los hongos endófitos son microorganismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de enfermedad y, recientemente, han empezado a ganar reconocimiento. Los hongos endófitos pueden funcionar como agentes patógenos latentes durante largos periodos y constituir interacciones asintomáticas, por lo que los micro-organismos en tal situación se pueden considerar como endófito temporales, tal como se ha observado en otras plantas (Ordóez *et al.*, 2012).

En esta técnica se presenta que el mayor costo en la micropropagación es la labor manual de los micropropagadores, esta representa entre el 40 - 60% del costo total de la operación de cultivo *in vitro* ya que cada explante debe ser dividido, preparado y colocado en la posición correcta dentro del medio de cultivo utilizado (Etienne y Berthouly, 2002), un costo que podría compararse a las posibles pérdidas de material debido a la contaminación de los explantes (Tudela, 2013).

Sin embargo, por mutación, un cambio en el ambiente, el estado nutricional o la edad de la planta, un endófito latente puede convertirse en patógeno o viceversa (Lana *et al.*, 2011).

Inclusive, existen casos en los que, a pesar de que el material utilizado son vitroplantas provenientes de semillas germinadas *in vitro* y que el medio de cultivo se encuentra adicionado con soluciones biostática (ARVI) que sirven para controlar cualquier contaminación endógena que interfiriera con los ensayos, se evidencia la contaminación por hongos filamentosos (Acuña, 2016).

La validez de la asepsia durante la desinfección para el cultivo *in vitro* de plantas tropicales ha sido documentada de forma limitada, a pesar de que esta estrategia es un factor clave para lograr el establecimiento y multiplicación óptima de estas especies (Mng'omba *et al.*, 2012). En el caso de la vainilla, existen diversidad de protocolos de micropropagación donde se mencionan procedimientos de desinfección (Tan *et al.*, 2011; Zuraida *et al.*, 2013; Mujar *et al.*, 2014).

No obstante, la literatura no indica la efectividad de tales procesos, con excepción del trabajo de quienes lograron un 90% de explantes libres de contaminación al utilizar 0,1% HgCl<sub>2</sub>, de los cuales, solo el 60% sobrevivió a la desinfección (Abebe *et al.*, 2009).

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Localización del sitio experimental

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla campus Teziutlán, la cual se encuentra en la longitud  $-97.367222$  y latitud  $19.876389$ , a una altura media de 1600 metros sobre el nivel del mar (Figura 1).

El Municipio se localiza en la transición de los climas templados de la Sierra Norte, a los cálidos del declive del Golfo; se identifican tres climas:

- Clima templado húmedo con lluvias en verano. Se presenta en una pequeña área del extremo Sur del Municipio.
- Clima templado húmedo con lluvias todo el año. Se intensifica en una en una franja latitudinal al centro y sur del Municipio.
- Clima Semicálido Húmedo, con abundantes lluvias todo el año. Se presenta en el Norte del Municipio (INAFED, 2019).



**Figura 1. Ubicación del laboratorio de cultivo de tejidos**

### 5.2. Material biológico utilizado

El material biológico utilizado en experimento, fueron secciones de tallo con yemas viables de *Vanilla planifolia* G Jackson, obtenidas del banco de germoplasma de vainilla de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ubicado en el municipio de Tenampulco

entre los paralelos 10° 08 30 y 20° 14 54 de Latitud Norte y los meridianos 97° 20 00 y 97°3000 de Longitud Oeste, a 210 metros sobre el nivel del mar.

### 5.3. Medios de cultivo, desinfección y siembra de explantes provenientes de campo

#### 5.3.1. Preparación de medios de cultivo

##### 5.3.1.1 Primer siembra

El medio de cultivo usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) a concentraciones del 100, 70, 40 y 10 % de la sal mineral (MS) y la sacarosa, a cada concentración se le adicionaron 2 ml L<sup>-1</sup> de agua de fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH (Triofanato metílico).

Para realizar un litro de cada medio de cultivo, se utilizó MS y sacarosa a diferentes porcentajes de concentración (Cuadro 1). Así mismo, en cada concentración, se utilizaron 4 gramos de agar.

**Cuadro 1. Cantidad de MS y sacarosa usado en medios de cultivo**

Reactivo	Concentración de MS y sacarosa (%)			
	100	70	40	10
	g L <sup>-1</sup>			
MS	4.4	3.08	1.76	0.44
Sacarosa	30	21	12	3

El MS y sacarosa fueron depositados en un matraz Erlenmeyer lleno de agua con capacidad de un litro al cual se le introdujo una barra de agitación. El matr az se calent o en agitación durante 15 minutos en un agitador con parrilla y placa de agitación integrada con una barra magnética, con el objetivo de disolver el MS y la sacarosa, posteriormente, se ajustó el pH a 5.7 ±1 con NaOH 0.1 N.

Seguido a esto y continuando con la agitación se agregó el agar al matraz y el medio fue sometido a calor con la parrilla integrada al agitador durante 15 minutos, posteriormente, se dio un intervalo de 1 minuto y pasado este tiempo, el medio volvió a ser sometido a calor durante otros 15 minutos, este proceso se siguió repitiendo hasta llegar a los 45 minutos con la finalidad de que el medio llegase al punto de ebullición.

Posteriormente, se adicionaron 15 ml del medio de cultivo en tubos de ensayo estériles con capacidad de 25 x 150 mm, los tubos fueron sellados con tapas plásticas y se pusieron

en una rejilla de 4 x 10 espacios, la cual se cubrió con papel aluminio. Para finalizar, las gradillas fueron esterilizadas durante 15 minutos en autoclave a 1.5 kg cm<sup>2</sup> de presión y 120 °C (Bello *et al.*, 2015).

Una vez esterilizado el medio y antes de solidificar, se le agregaron 2 gr L<sup>-1</sup> del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH, ingrediente activo Tiofanato de metilo: dimetil 4,4'-(o-fenilen) bis(3-tioalofanato) al 70.0% el cual fue filtrado con un filtro para jeringa esteril de 25 mm.

### **5.3.1.2. Segunda siembra**

El medio de cultivo usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962), realizado siguiendo la metodología descrita en la primera siembra.

### **5.3.1.3. Tercer siembra**

El medio de cultivo usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) a concentraciones del 100, 70, 40 y 10 % de la sal mineral y la sacarosa, a cada concentración se le adicionaron 2 ml L<sup>-1</sup> de agua de fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH (Triofanato metílico), 2 g L<sup>-1</sup> de Carbón Activo, 1 g L<sup>-1</sup> de Ácido Cítrico y 1 g L<sup>-1</sup> de Ácido Ascórbico.

Para realizar un litro de cada medio de cultivo, se utilizó MS y sacarosa a diferentes porcentajes de concentración (Cuadro 1). Así mismo, en cada concentración, se utilizaron 4 gramos de agar.

El MS y sacarosa fueron depositados en un matraz Erlenmeyer lleno de agua con capacidad de un litro al cual se le introdujo una barra de agitación. El matraz fue colocado en un agitador magnético con placa de agitación y parrilla para calentar integrada, durante 15 minutos con el objetivo de disolver el MS y la sacarosa, posteriormente, se ajustó el pH a 5.7 ±1 con NaOH 0.1 N, posteriormente se agregaron 2 g L<sup>-1</sup> de Carbón Activo, 1 g L<sup>-1</sup> de Ácido Cítrico y 1 g L<sup>-1</sup> de Ácido Ascórbico.

Seguido a esto se agregó el agar al matraz y continuando con la agitación, el medio fue sometido a calor con la parrilla integrada al agitador durante 15 minutos, posteriormente, se dio un intervalo de 1 minuto y pasado este tiempo, el medio volvió a ser sometido a calor durante otros 15 minutos, este proceso se siguió repitiendo hasta llegar a los 45 minutos con la finalidad de que el medio llegase al punto de ebullición.

Posteriormente, se adicionaron 15 ml del medio de cultivo en tubos de ensayo estériles con capacidad de 25 x 150 mm, los tubos fueron sellados con tapas plásticas y se pusieron en una rejilla de 4 x 10 espacios, la cual se cubrió con papel aluminio. Para finalizar, las gradillas fueron esterilizadas durante 15 minutos en autoclave a  $1.5 \text{ kg cm}^2$  de presión y  $120^\circ\text{C}$  (Bello *et al.*, 2015).

Una vez esterilizado el medio y antes de solidificar, se le agregaron  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH, ingrediente activo Tiofanato de metilo: dimetil 4,4'-(o-fenilen) bis(3-tioalofanato) al 70.0% el cual fue filtrado con un filtro para jeringa esteril de 25 mm.

#### 5.3.1.4. Cuarta siembra

El medio de cultivo usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) a concentraciones del 70 y 40 % de la sal mineral y la sacarosa, el MS fue preparado con sales minerales puras, realizando modificaciones en las dosis usadas, en relación con los requerimientos de la vainilla, se realizaron tres medios de cultivo diferentes por cada concentración de MS y sacarosa, a cada uno se le adicionaron  $2 \text{ mL L}^{-1}$  de fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH (Triofanato metílico). Y cada medio fue adicionado con  $2 \text{ mL L}^{-1}$  de agua de coco y  $2 \text{ mL L}^{-1}$  de 6 – Bencilaminopurina (BAP) según la Cuadro 2.

**Cuadro 2. Medios de cultivo modificados de MS**

Medio	Reactivo	70%	40%
		g L <sup>-1</sup> /mL L <sup>-1</sup>	
<b>MS Modificado + BAP + Fungicida.</b>	6 –		
	Bencilaminopurina	2	2
<b>MS Modificado + Fungicida + Agua De Coco</b>	agua de coco	2	2

Para realizar un litro de cada medio de cultivo, se utilizó MS (Cuadro 3) y sacarosa a diferentes porcentajes de concentración (Cuadro 1). Así mismo, en cada concentración, se utilizaron 4 gramos de agar.

**Cuadro 3. Cantidad de sales minerales para la realización de MS modificado.**

Reactivo	100%	70%	40%	10%
	g L <sup>-1</sup>			
Ácido bórico	0.0063	0.00441	0.00252	0.00063
Cloruro de calcio	0.5	0.35	0.2	0.05
Sulfato cúprico	0.00025	0.000175	0.0001	0.000025
Sulfato de magnesio	0.37	0.259	0.148	0.037
Sulfato ferroso	0.0278	0.01946	0.01112	0.00278
Sulfato de manganeso	0.0169	0.01183	0.00676	0.00169
Yoduro de potasio	0.001	0.0007	0.0004	0.0001
Nitrato de potasio	2	1.4	0.8	0.2
Fosfato de potasio	0.2	0.14	0.08	0.02
Molibdato de sodio	0.00025	0.000175	0.0001	0.000025
Sulfato de zinc	0.0086	0.00602	0.00344	0.00086
<b>Total</b>	<b>3.1311</b>	<b>2.19177</b>	<b>1.25244</b>	<b>0.31311</b>

El MS y sacarosa fueron depositados en un matraz Erlenmeyer lleno de agua con capacidad de un litro al cual se le introdujo una barra de agitación. El matraz fue colocado en un agitador magnético con placa de agitación y parrilla para calentar integrada, durante 15 minutos con el objetivo de disolver el MS y la sacarosa, posteriormente, se ajustó el pH a  $5.7 \pm 1$  con NaOH 0.1 N, sucesivamente, se agregaron con 2 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco y 2 mL L<sup>-1</sup> de 6 – Bencilaminopurina (BAP) según el Cuadro 2.

Seguido a esto se agregó el agar al matraz y continuando con la agitación, el medio fue sometido a calor con la parrilla integrada al agitador durante 15 minutos, posteriormente, se dio un intervalo de 1 minuto y pasado este tiempo, el medio volvió a ser sometido a calor durante otros 15 minutos, este proceso se siguió repitiendo hasta llegar a los 45 minutos con la finalidad de que el medio llegase al punto de ebullición.

Posteriormente, se adicionaron 15 ml del medio de cultivo en tubos de ensayo estériles con capacidad de 25 x 150 mm, los tubos fueron sellados con tapas plásticas y se pusieron en una rejilla de 4 x 10 espacios, la cual se cubrió con papel aluminio. Para finalizar, las

gradillas fueron esterilizadas durante 15 minutos en autoclave a  $1.5 \text{ kg cm}^2$  de presión y  $120^\circ\text{C}$  (Bello *et al.*, 2015).

Una vez el medio esterilizado y antes de solidificar, se le agregaron  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH, ingrediente activo Tiofanato de metilo: dimetil 4,4'-(o-fenilen) bis(3-tioalofanato) al 70.0% y 15 micro litros ( $\mu\text{l}$ ) de estreptomicina los cuales fueron filtrados con un filtro para jeringa esteril de 25 mm.

#### **5.3.1.5. Quinta siembra**

El medio de cultivo usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) a concentraciones del 100 y 40 % de la sal mineral y sacarosa, el MS fue preparado con sales minerales puras, realizando modificaciones en las dosis usadas, en relación con los requerimientos de la vainilla.

Para realizar un litro de cada medio de cultivo, se utilizó MS (Cuadro 3) y sacarosa a diferentes porcentajes de concentración (Cuadro 1). Así mismo, en cada concentración, se utilizaron 4 gramos de agar.

El MS y sacarosa fueron depositados en un matraz Erlenmeyer lleno de agua con capacidad de un litro al cual se le introdujo una barra de agitación. El matraz fue colocado en un agitador magnético con placa de agitación y parrilla para calentar integrada, durante 15 minutos con el objetivo de disolver el MS y la sacarosa, posteriormente, se ajustó el pH a  $5.7 \pm 1$  con NaOH 0.1 N.

Seguido a esto se agregó el agar al matraz y continuando con la agitación, el medio fue sometido a calor con la parrilla integrada al agitador durante 15 minutos, posteriormente, se dio un intervalo de 1 minuto y pasado el tiempo, el medio volvió a ser sometido a calor durante otros 15 minutos, este proceso se siguió repitiendo hasta llegar a los 45 minutos con la finalidad de que el medio llegase al punto de ebullición.

Posteriormente, se adicionaron 15 ml del medio de cultivo en tubos de ensayo estériles con capacidad de 25 x 150 mm, los tubos fueron sellados con tapas plásticas y se pusieron en una rejilla de 4 x 10 espacios, la cual se cubrió con papel aluminio. Para finalizar, las gradillas fueron esterilizadas durante 15 minutos en autoclave a  $1.5 \text{ kg cm}^2$  de presión y  $120^\circ\text{C}$  (Bello *et al.*, 2015).

Una vez esterilizado el medio y antes de solidificar, se le agregaron  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH, ingrediente activo Tiofanato de metilo: dimetil 4,4'-(o-

fenilen) bis(3-tioalofanato) al 70.0% y 15 micro litros ( $\mu\text{l}$ ) de estreptomicina. Así mismo, antes de que el medio solidificara, se le añadieron  $3 \text{ mL L}^{-1}$  de agua de coco filtrada extras a los  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH y 15 micro litros ( $\mu\text{l}$ ) de estreptomicina los cuales fueron filtrados con un filtro para jeringa esteril de 25 mm.

#### **5.3.1.6. Sexta siembra**

El medio de cultivo usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962), realizado siguiendo la metodología descrita en la quinta siembra.

### **5.3.2. Proceso de desinfección de explantes.**

#### **5.3.2.1 Primer siembra**

Con la finalidad de remover impurezas provenientes de campo, se cortaron cuidadosamente las hojas y raíces adventicias del tallo, posteriormente, para facilitar el manejo de la planta, se realizaron cortes a lo largo del tallo para obtener segmentos que tuvieran de 3 a 4 yemas axilares sanas.

Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5% marca Clarasol®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.

Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en  $2 \text{ g L}^{-1}$  fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo). Seguido a esto, se realizaron cuatro enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H donde los explantes fueron tratados por 15 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 30% + tween80.

Posteriormente, se dieron otros cuatro enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por 2 minutos en alcohol al 70% y con la finalidad de remover excesos se dieron cuatro enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.

#### **5.3.2.2. Segunda siembra**

Se obtuvieron esquejes de *Vainilla planifolia G. Jackson* con yemas maduras viables, se cortaron cuidadosamente las hojas y raíces adventicias del tallo, posteriormente, para facilitar

el manejo de la planta, se realizaron cortes a lo largo del tallo para obtener segmentos que tuvieran de 3 a 4 yemas axilares sanas.

Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5% marca Clarasol®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.

Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en 2 g L<sup>-1</sup> fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo). Seguido a esto, se realizaron cuatro enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H donde los explantes fueron tratados por 10 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 30% + tween80.

Posteriormente, se dieron otros cuatro enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por 2 minutos en alcohol al 70% y con la finalidad de remover excesos se dieron 4 enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.

En esta siembra únicamente se modificó el tiempo de exposición al cloro, 10 minutos en comparación con la primera siembra, la cual fue de 15 minutos.

### **5.3.2.3. Tercer siembra**

Los primeros 10 centímetros del tallo de los esquejes de *Vainilla planifolia* G. Jackson obtenidos, fueron sumergidos en agua estéril adicionada con 2 g L<sup>-1</sup> del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo) por 5 días a una temperatura de 28 °C.

Con la finalidad de remover impurezas provenientes de campo, se cortaron cuidadosamente las hojas y raíces adventicias del tallo, posteriormente, para facilitar el manejo de la planta, se realizaron cortes a lo largo del tallo para obtener segmentos que tuvieran de 3 a 4 yemas axilares sanas.

Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5% marca Clarasol®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.

Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en  $2 \text{ g L}^{-1}$  fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo). Seguido a esto, se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H donde los explantes fueron tratados por 3 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 10% + tween80.

Posteriormente, se dieron otros 4 enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por medio minuto en alcohol al 70% y con la finalidad de remover excesos se dieron cuatro enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.

En esta siembra, se modificó la concentración y tiempo de exposición al cloro, al 10% y 3 minutos en comparación con la segunda siembra.

#### **5.3.2.4. Cuarta siembra**

De la misma manera que en la tercera siembra, los explantes obtenidos de *Vainilla planifolia* G. Jackson con yemas maduras viables, cuyos primeros 10 centímetros del tallo fueron sumergidos en agua estéril preparada con  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo) por 3 días a una temperatura de 28 °C.

Con la finalidad de remover impurezas provenientes de campo, se cortaron cuidadosamente las hojas y raíces adventicias del tallo, posteriormente, para facilitar el manejo de la planta, se realizaron cortes a lo largo del tallo para obtener segmentos que tuvieran de 3 a 4 yemas axilares sanas.

Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5% marca Clarasol®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.

Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en  $2 \text{ g L}^{-1}$  fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo). Seguido a esto, se realizaron cuatro enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H donde los explantes fueron tratados por 3 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 7% + tween80.

Posteriormente, se dieron otros cuatro enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por medio minuto en alcohol al 70% y con la finalidad de remover excesos se dieron cuatro enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.

En esta siembra únicamente se modificó la concentración del cloro al 7% en comparación con la tercera siembra.

#### **5.3.2.5. Quinta siembra**

Se obtuvieron esquejes de *Vainilla planifolia G. Jackson* con yemas maduras viables, cuyos primeros 10 centímetros del tallo fueron sumergidos en agua estéril preparada con polivinilpirrolidone (PVPP) al 5%,  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo) y  $2 \text{ mL L}^{-1}$  un regulador de crecimiento vegetal complementado con auxinas, citoquininas y giberelinas, marca BIOCROP® por dos días.

Con la finalidad de remover impurezas provenientes de campo, se cortaron cuidadosamente las hojas y raíces adventicias del tallo, posteriormente, para facilitar el manejo de la planta, se realizaron cortes a lo largo del tallo para obtener segmentos que tuvieran de 3 a 4 yemas axilares sanas.

Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.

Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante media hora en extracto concentrado de moringa  $500 \text{ mL L}^{-1}$  filtrado dos veces en papel filtro 110 Ø marca Whatman como método antioxidante, pasado el tiempo, se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril, seguido a esto, se dejó en inmersión por una hora en  $2 \text{ g L}^{-1}$  fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo), en combinación con  $2 \text{ mL L}^{-1}$  del fungicida de contacto CAPTAN 80 WG®.

Pasado el tiempo se realizaron cuatro enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H, posterior a esto los explantes fueron tratados por 5 segundos en constante agitación con  $\text{HgCl}_2$  en una concentración del 0.025%, se retiraron excesos del  $\text{HgCl}_2$  con cuatro enjuagues de agua desionizada estéril y por 10 segundos los explantes se mantuvieron en agitación en una solución de cloro al 0.25% + tween.

Posteriormente, se dieron otros cuatro enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por 5 segundos en alcohol al 50% y con la finalidad de remover excesos se dieron cuatro enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.

En esta siembra en comparación con las demás, fueron usados reguladores de crecimiento, bicloruro de mercurio y tanto el tiempo de exposición, como la concentración de cloro fueron reducidos al 0.25% por 10 segundos, así mismo, la concentración del alcohol fue reducida al 50% con una exposición de 5 segundos.

#### **5.3.2.6. Sexta siembra**

El protocolo de desinfección usado fue el propuesto por la metodología descrita en la quinta siembra.

#### **5.3.3. Siembra de explantes**

Con el objetivo de resolver el problema de contaminación y oxidación de los explantes de vainilla provenientes de campo, se llevaron a cabo seis siembras en medios de cultivos en porcentajes del 100, 70, 40 y 10 % de MS y sacarosa.

La siembra de explantes se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, cuyas paredes fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70% y flameada, así mismo el material a utilizado como pinzas, bisturís y tapas de cajas Petri, fue flameado con alcohol al 90% con la finalidad de evitar contaminaciones externas en el medio de cultivo.

Con el apoyo de un bisturí con hoja número 20 y un bisturí con hoja número 15, se cortaron los extremos sobrantes de cada yema, procurando eliminar gran parte del material vegetal innecesario y con pinzas bacteriológicas se sembraron los explantes de manera que el material vegetal quedara completamente horizontal, se sellaron las tapas con papel adherible de un ancho de 3 cm, cada tubo fue etiquetado con: fecha de siembra, numero de tratamiento, numero de repetición y nombre del cultivo.

Los tubos fueron puestos en una cámara de crecimiento a  $28 \pm 2$  °C, con lámparas de luz fluorescente y un fotoperiodo de 16 h luz (Bello *et al.*, 2015).

## **5.4. Medios de cultivo y siembra de explantes provenientes de subcultivos de *V. planifolia* G. Jackson**

### **5.4.1. Preparación de medio de cultivos para la siembra de subcultivos**

El medio de cultivo usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) a concentraciones del 100 y 40 % de la sal mineral y la sacarosa, el MS fue preparado con sales minerales puras, realizando modificaciones en las dosis usadas, en relación con los requerimientos de la vainilla.

Para realizar un litro de cada medio de cultivo, se utilizó MS (Cuadro 3) y sacarosa a diferentes porcentajes de concentración (Cuadro 1). Así mismo, en cada concentración, se utilizaron 4 gramos de agar.

El MS y sacarosa fueron depositados en un matraz Erlenmeyer lleno de agua con capacidad de un litro al cual se le introdujo una barra de agitación. El matraz fue colocado en un agitador magnético con placa de agitación y parrilla para calentar integrada, durante 15 minutos con el objetivo de disolver el MS y la sacarosa, posteriormente, se ajustó el pH a  $5.7 \pm 1$  con NaOH 0.1 N.

Seguido a esto se agregó el agar al matraz y continuando con la agitación, el medio fue sometido a calor con la parrilla integrada al agitador durante 15 minutos, posteriormente, se dio un intervalo de 1 minuto y pasado el tiempo, el medio volvió a ser sometido a calor durante otros 15 minutos, este proceso se siguió repitiendo hasta llegar a los 45 minutos con la finalidad de que el medio llegase al punto de ebullición.

Posteriormente, se adicionaron 15 mililitros del medio de cultivo en tubos de ensayo estériles con capacidad de 25 x 150 mm, los tubos fueron sellados con tapas plásticas y se pusieron en una rejilla de 4 x 10 espacios, la cual se cubrió con papel aluminio. Para finalizar, las gradillas fueron esterilizadas durante 15 minutos en autoclave a  $1.5 \text{ kg cm}^2$  de presión y  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  (Bello *et al.*, 2015).

Una vez esterilizado el medio y antes de solidificar, se le agregaron  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH, ingrediente activo Tiofanato de metilo: dimetil 4,4'-(o-fenilen) bis(3-tioalofanato) al 70.0% y 15 micro litros ( $\mu\text{l}$ ) de estreptomycin. Así mismo, de cada tratamiento fue tomada la mitad de los tubos y antes de que el medio de cultivo solidificase, se le añadieron  $3 \text{ mL L}^{-1}$  de agua de coco filtrada extras a los  $2 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH y 15 micro litros ( $\mu\text{l}$ ) de estreptomycin.

#### **5.4.2. Proceso de siembra de subcultivos**

Se obtuvieron explantes desarrollados de *V. planifolia* del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras (INIFAP), sobrevivientes de los ensayos realizados durante el periodo de estancia en otoño del 2018, las cuales fueron cuidadas y subcultivadas durante un año en la institución.

La siembra de los subcultivos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, cuyas paredes fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70% y flameada, así mismo el material a utilizado como pinzas, bisturís y tapas de cajas Petri, fue flameado con alcohol al 90% con la finalidad de evitar contaminaciones externas en el medio de cultivo.

Una vez desinfectada la campana de flujo laminar, se procedió a abrir los tubos con yemas desarrolladas de *V. planifolia*, para posteriormente con ayuda de un par de pinzas de bacteriológicas, retirar del medio de cultivo los explantes y con el apoyo de un bisturí con hoja número 11, cada explante fue segmentado, procurando extraer las yemas desarrolladas y dejar entre cada corte de medio centímetro a 1 centímetro, máximo, de tallo.

Seguido a esto, con pinzas bacteriológicas se sembraron los explantes de manera que el material vegetal quedara completamente horizontal, se sellaron las tapas con papel adherible de un ancho de 3 cm y cada tubo fue etiquetado con: fecha de siembra, numero de tratamiento, numero de repetición, nombre del cultivo y tipo de medio utilizado.

Los tubos fueron puestos en una cámara de crecimiento a  $28 \pm 2$  °C, con lámparas de luz fluorescente y un fotoperiodo de 16 h luz (Bello *et al.*, 2015).

#### **5.5. Distribución de tratamientos y análisis estadístico**

Los tratamientos evaluados en cada siembra, fueron las diferentes concentraciones de MS y sacarosa (100 %, 70 %, 40 % y 10 %) con fungicida sistémico sin agua de coco y las concentraciones de MS y sacarosa (100 %, 70 %, 40 % y 10 %) con fungicida sistémico más agua de coco. Los cuatro tratamientos fueron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar.

#### **5.6. Variables evaluadas**

##### **5.6.1. Días de viabilidad de la planta**

Se evaluó la cantidad de días que un explante de *Vainilla planifolia* G. Jackson se mantiene en el medio de cultivo sin presentar problemas de oxidación o contaminación.

### **5.6.2. Oxidación en los explantes**

Para cada tratamiento, se registró la cantidad de días que un explante de *Vainilla planifolia* G. Jackson presenta incidencia de oxidación.

### **5.6.3. Presencia de contaminación**

Para cada tratamiento, se registró la cantidad de días que un explante de *Vainilla planifolia* G. Jackson presenta incidencia de contaminación.

### **5.6.4. Presencia de oxidación – contaminación**

Para cada tratamiento, se registró la cantidad de días que un explante de *Vainilla planifolia* G. Jackson presenta incidencia de oxidación en conjunto con contaminación.

### **5.6.5. Días a la brotación**

Se contabilizaron los días que el explante tardó en generar ya sea raíces, hojas o rebrotes de yemas.

### **5.6.6. Estimación de la longitud del rebrote**

Con el apoyo de una regla graduada en centímetros y milímetros, se llevó a cabo la estimación de la longitud del rebrote, desde la base de la yema, hasta el ápice del rebrote.

### **5.6.7. Numero de hojas**

De manera visual se contabilizó el número de hojas formadas en los explantes.

### **5.6.8. Longitud de raíces**

Con el apoyo de una regla graduada en centímetros y milímetros, se llevó a cabo la estimación de la longitud de las raíces.

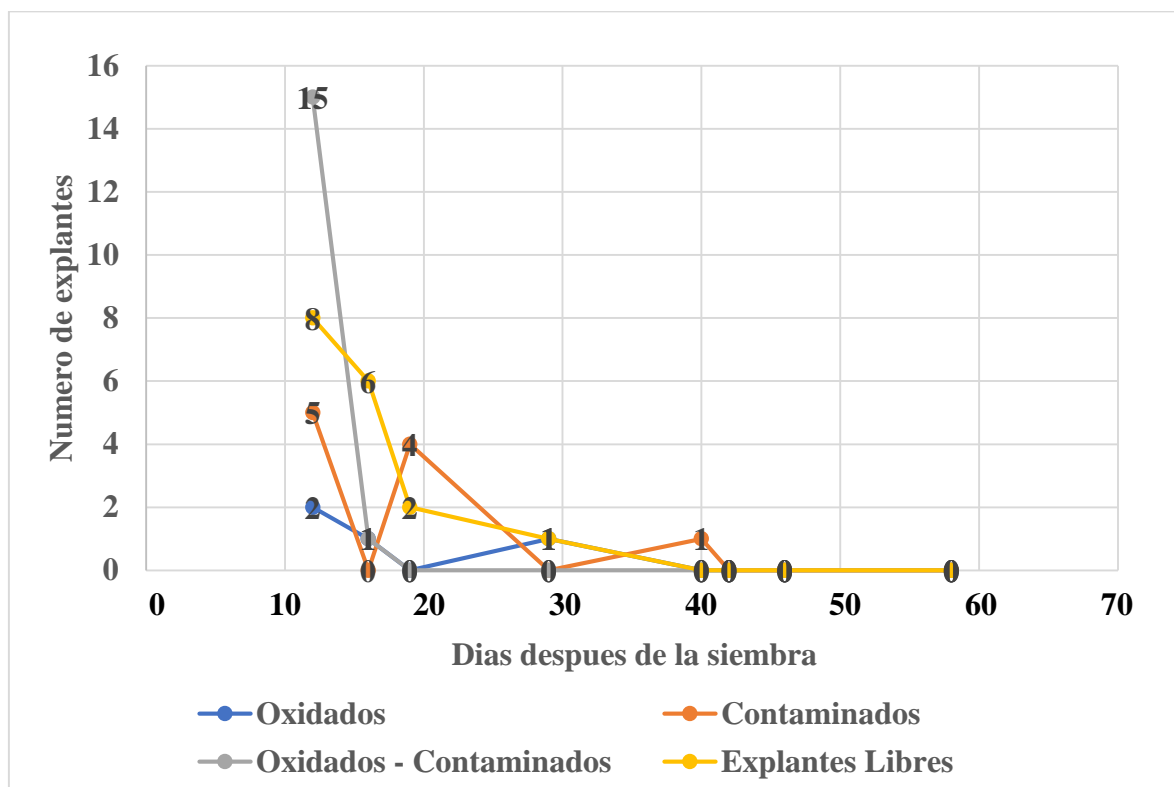
## **5.7. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de los explantes provenientes de campo y subcultivos, fueron analizados por medio de una ANOVA y la prueba de comparación de diferencia mínima significativa LSD, con el paquete estadístico SAS versión 9.0.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1. Problemas de contaminación y oxidación

Dentro de los problemas que se presentaron en el presente estudio de reproducción *in vitro* de explantes de vainilla provenientes de campo fue la contaminación, oxidación y contaminación-oxidación (Figura 2), en todos los tratamientos considerados.

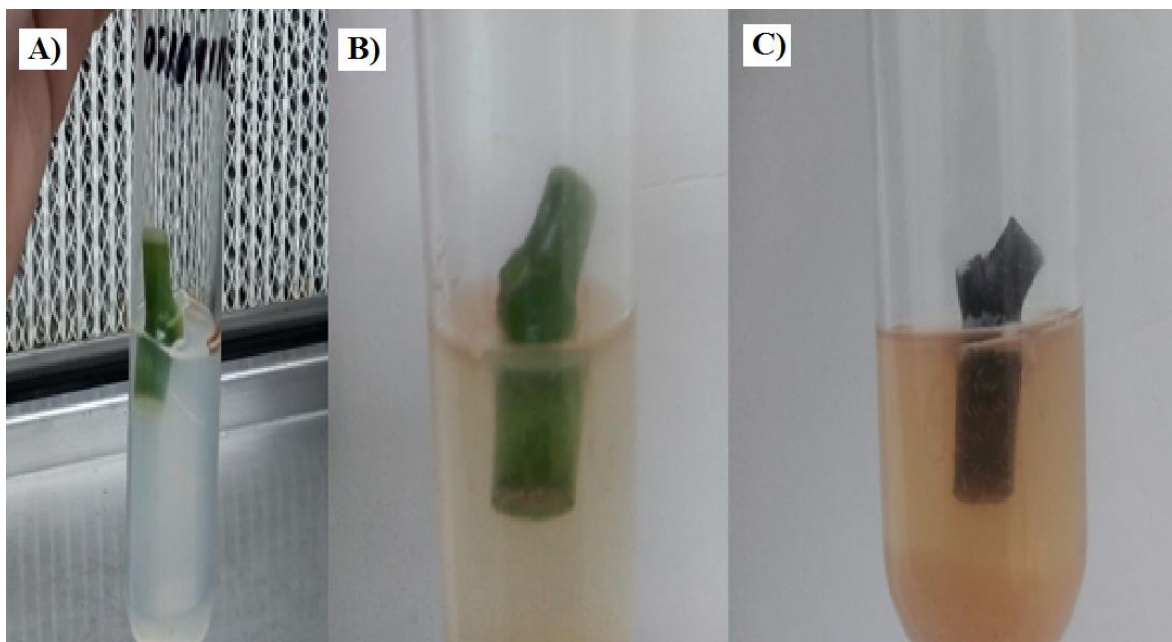


**Figura 2. Numero de explantes contaminados, oxidados, contaminados-oxidados y viables.**

En la Figura 2, la oxidación de manera conjunta con la contaminación, provoco la muerte de los explantes a los 20 días después de la siembra y únicamente un explante quedo libre hasta los 40 días después de la siembra en donde también murió por contaminación fungica.

La oxidación se reflejó en cambios de tonalidades en los explantes y medios de cultivo, ya que los explantes que en un inicio poseían una tonalidad verde brillante en un medio

transparente-claro (Figura 3A), se fueron tornando de una tonalidad café canela de manera gradual (Figura 3B), hasta llegar a la necrosis (Figura 3C).



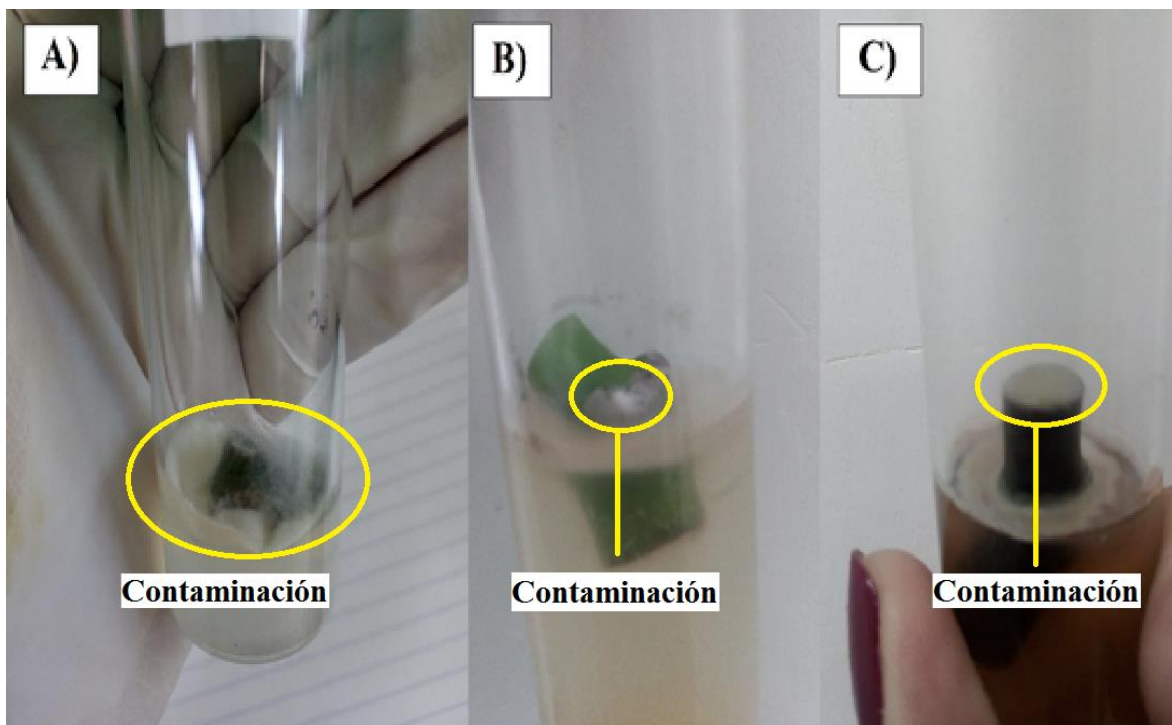
**Figura 3. Izquierda (A): explante sano; centro (B) explante con tonalidad canela; derecha (C): explante con necrosis.**

Estos cambios tanto en el explante como en el medio de cultivo y que finalizan con la necrosis de los cultivos, es debido a la ausencia de cloroplastos, u organelos básicos para generar energía suficiente para las funciones celulares básicas (Taiz y Zeiger, 2006).

En relación a la contaminación, su sintomatología fue variada, debido a que en algunos tratamientos se presentó micelio blanco, en la base del explante en el área del medio de cultivo (Figura 4A). En otros la contaminación se presentó en el área de las raíces adventicias, posiblemente debido a que en dicha área es difícil llevar a cabo una desinfección eficiente (Figura 4B). Así mismo, la contaminación también se presentó en la sección superior del explante (Figura 4C).

En este sentido, autores como Azofeifa et al. (2019), Bello et al. (2015), Menchaca (2011), Spinoso (2013), mencionan los mismos problemas en reproducción *in vitro* de vainilla.

Así mismo, este problema también es reportado por autores como Carrillo et al. (2011) en *Pseudotsuga menziesii* var. *Glauca*, Flores (2017) en orquídeas y Vilchez (2009) en *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott.



**Figura 4. Izquierda (A): presencia de micelio blanco en la base del explante; centro (B) contaminación en el área de las raíces adventicias; derecha (C): contaminación en el corte aéreo del explante.**

Sulvaran (2018), reporta que los contaminantes por hongos en *Vanilla planifolia* en México corresponden a la cepa perteneciente a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.

Así mismo, Azofeifa y colaboradores (2019), mencionan que la contaminación asociada a segmentos nodales en *V. planifolia* en Costa Rica fue a causa de *F. oxysporum*, *F. solani*, *Phoma sp.* y *Erwinia sp.*

## **6.2. Medios de cultivo, desinfección y siembras de explantes provenientes de campo**

En el Cuadro 4, se presenta el tren de desinfección, medios utilizados y resultados de cada siembra realizada. Como puede observarse las principales variantes en el tren de desinfección consistieron en la exposición de los explantes en tiempo y concentración al cloro, bicloruro de mercurio y alcohol, los cuales tuvieron efectos significativos en los resultados obtenidos,

En la primera siembra, en la cual los explantes fueron expuestos por 15 minutos en una solución de cloro al 30 % + tween80, estos murieron a los 6 días después de la siembra, para los tratamientos al 100 %, 70 % y 10 %, y 10 días después de la siembra para el tratamiento al 40 %.

En la segunda siembra, los explantes fueron tratados por 10 minutos en una solución de cloro al 30 % + tween, 5 minutos menos que en la anterior siembra, lo que permitió alargar los periodos de vida de los explantes, ya que en el tratamiento al 100 % y 70 % murieron por oxidación a los 20 días, mientras que el tratamiento al 40 % y 10 % murieron a los 31 días después de la siembra.

En la tercera siembra, donde se disminuyó el tiempo de exposición y concentración en la solución de cloro por 3 minutos al 10 % + tween, doce minutos menos que en la primera siembra, y 20 % menos de concentración de cloro + tween que, en la primera y segunda siembra, en el tratamiento al 70 % registro un periodo de vida de los explantes de 31 días, mientras que en el tratamiento al 40 % y 10 % 49 días después de la siembra.

En la siembra 4, los explantes fueron sometidos por 3 minutos en una solución de cloro al 7 % y en el medio de cultivo se incluyó 6-bencilaminopurina (BAP), lo que afecto el periodo de vida de los explantes, ya que en el tratamiento al 100 % el periodo de vida fue de 39 días y en los tratamientos al 70 % y 40 % se redujo su periodo de vida a los 20 días.

En la quinta siembra en el tren de desinfección se incluyó el bicloruro de mercurio en una dosis de 0.025 % por 5 segundos, así mismo, se disminuyó la concentración de cloro al 0.25 %, así como el alcohol al 50 %. También en el medio utilizado se incluyó agua de coco, lo que permitió que el periodo de vida de los explantes se extendiera ya que los tratamientos al 100 % y 70 % duraron 38 días después de la siembra y los tratamientos de 40 % y 10 % tuvieron una duración de 45 días después de la siembra.

En esta siembra, el 30 % de los explantes se mantuvieron sanos y viables, sin embargo, la aparición de raíces y rebrotes se retardo.

**Cuadro 4. Desinfección, medios utilizados y resultados de reproducción *in vitro* en *V. planifolia* G. Jackson**

Siembra	Tren de Desinfección	Tratamiento	Resultados
1	<p>Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5% marca Clarasol®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.</p> <p>Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en 2 gr L<sup>-1</sup> fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo).</p> <p>Pasado el tiempo se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H, posterior a esto los explantes fueron tratados por 15 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 30% + tween.</p> <p>Posteriormente, se dieron otros 4 enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por 2 minutos en alcohol al 70% y con la finalidad de remover excesos se dieron 4 enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.</p>	<p>100 % MS + Fungicida            70 % MS + Fungicida            40 % MS + Fungicida            10 % MS + Fungicida</p>	<p>A los 6 días de la siembra, los explantes bajo un tratamiento del 100 %, 70 % y 10 % de MS y sacarosa murieron por oxidación, así mismo el tratamiento al 40% después de 10 días después de su siembra, presento muerte total por oxidación.</p>

**Cuadro 4. Continuación.**

2	<p>Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5% marca Clarasol®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.</p>	<p>100 % MS + Fungicida 70 % MS + Fungicida 40 % MS + Fungicida 10 % MS + Fungicida</p>	<p>A los 20 días de la siembra, los explantes bajo un tratamiento de 100 % de MS y sacarosa murieron por oxidación, así mismo el tratamiento al 70 % presento muerte total de explantes al día 20 a causa de contaminación en combinación con oxidación, por otro lado, los tratamientos al 40 % y 10 % después de 31 días después de su siembra, presento muerte total por contaminación en combinación con oxidación.</p>
	<p>Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en 2 gr L<sup>-1</sup> fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo).</p>		
	<p>Pasado el tiempo se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H, posterior a esto los explantes fueron tratados por 10 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 30 % + tween80.</p>		
	<p>Posteriormente, se dieron otros 4 enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por 2 minutos en alcohol al 70 % y con la finalidad de remover excesos se dieron 4 enjuagues nuevamente con agua desionizada estéril.</p>		

**Cuadro 4. Continuación.**

3	<p>Los primeros 10 centímetros del tallo de esquejes de Vainilla planifolia G. Jackson con yemas maduras viables, cuyos fueron sumergidos en agua estéril adicionada con 2 gr L<sup>-1</sup> del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo) por 5 días a una temperatura de 28 °C.</p>	<p>MS 100 % + Fungicida + Carbon + Activo + Acido Citrico + Acido Ascorbico</p>	<p>A los 10 días de la siembra, los explantes bajo un tratamiento de 100 % de MS y sacarosa murieron por contaminación en combinación con oxidación, así mismo el tratamiento al 70 % presento muerte total de explantes al día 31 a causa de contaminación, por otro lado, el tratamiento al 40 % y 10 % después de 49 días después de su siembra, presentaron muerte total por contaminación en combinación con oxidación.</p>
	<p>Con la finalidad de remover impurezas provenientes de campo, se cortaron cuidadosamente las hojas y raíces adventicias del tallo, posteriormente, para facilitar el manejo de la planta, se realizaron segmentaciones a lo largo del tallo, procurando que cada segmento posea de 3 a 4 yemas axilares sanas.</p>	<p>MS 70 % + Fungicida + Carbon + Activo + Acido Citrico + Acido Ascorbico</p>	<p>MS 40 % + Fungicida + Carbon + Activo + Acido Citrico + Acido Ascorbico</p>
	<p>Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5 % marca Clarasol ®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.</p>	<p>MS 10 % + Fungicida + Carbon + Activo + Acido Citrico + Acido Ascorbico</p>	<p>MS 10 % + Fungicida + Carbon + Activo + Acido Citrico + Acido Ascorbico</p>
	<p>Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante una hora en 2 gr L<sup>-1</sup> fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo).</p>		
	<p>Pasado el tiempo se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech ®, modelo LCB-1202H, posterior a esto los explantes fueron tratados por 3 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 10 % + tween.</p>		
	<p>Posteriormente, se dieron otros 4 enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por medio minuto en alcohol al 70 %.</p>		

**Cuadro 4. Continuación.**

<p><b>4</b></p>	<p>De la misma manera que en la tercera siembra, los primeros 10 centímetros del tallo fueron sumergidos en agua estéril preparada con 2 gr L<sup>-1</sup> del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo) por 3 días a una temperatura de 28 °C.</p> <p>Se cortaron cuidadosamente las hojas y raíces adventicias del tallo, posteriormente, para facilitar el manejo de la planta, se realizaron segmentaciones a lo largo del tallo, procurando que cada segmento posea de 3 a 4 yemas axilares sanas.</p> <p>Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma® y cloro activo en la presentación comercial a base de hipoclorito de sodio al 5 % marca Clarasol ®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento con ayuda de un bisturí, dejando un centímetro de tallo en cada extremo de la yema.</p> <p>Una vez obtenidas las yemas, los explantes se dejaron en inmersión durante dos horas en 2 gr L<sup>-1</sup> fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo).</p> <p>Pasado el tiempo se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech ®, modelo LCB-1202H, posterior a esto los explantes fueron tratados por 3 minutos en constante agitación en una solución de cloro al 7 % + tween.</p> <p>Posteriormente, se dieron otros 4 enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por medio minuto en alcohol al 70 %.</p>	<p>MS Modificado 70 % + Fungicida + Agua De Coco. MS Modificado 70 % + BAP + Fungicida. MS Modificado 40 % + Fungicida + Agua De Coco. MS Modificado 40 % + BAP + Fungicida.</p>	<p>A los 39 días de la siembra, los explantes bajo un tratamiento de 100 % de MS y sacarosa murieron por contaminación en combinación con oxidación, así mismo el tratamiento al 70 % y 40 % presentaron muerte total de explantes al día 20, el primero a causa de oxidación y el segundo a causa de contaminación, por otro lado, el tratamiento al 10 % después de 30 días después de su siembra, presento muerte total por contaminación.</p>
-----------------	--	--	---

**Cuadro 4. Continuación.**

5	<p>Los primeros 10 centímetros del tallo de Vainilla planifolia G. Jackson con yemas maduras viables, fueron sumergidos en agua estéril preparada con polivinilpirrolidone (PVPP) al 5 %, 2 gr L<sup>-1</sup> del fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo) y 2 ml L<sup>-1</sup> un regulador de crecimiento vegetal complementado con auxinas, citoquininas y giberelinas, marca BIOCROP® por 3 días.</p>	<p>MS Modificado 100 % + Fungicida + Coco MS Modificado 70 % + Fungicida + Coco MS</p>	<p>A los 38 días de la siembra, los explantes bajo un tratamiento del 100 y 70 % de MS y sacarosa murieron por oxidación, así mismo el tratamiento al 40 % al día 45 registro pérdidas de explantes a causa de contaminación, indicando un 60 % de explantes libres de oxidación o contaminación, mientras el tratamiento al 10 % a 45 días de su siembra, presento muertes por oxidación, manteniendo un 30 % de explantes sanos y viables.</p>
	<p>Cada explante fue sometido a cuatro lavados continuos con agua corriente, jabón en polvo biodegradable marca Roma®, posterior a esto, las yemas fueron extraídas de cada segmento.</p>	<p>Modificado 40 % + Fungicida + Coco MS</p>	
	<p>Los explantes se dejaron en inmersión durante media hora en extracto concentrado de moringa 500 ml L<sup>-1</sup> filtrado dos veces en papel filtro 110 Ø marca Whatman como método antioxidante, pasado el tiempo, se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril, seguido a esto, se dejó en inmersión por una hora en 2 gr L<sup>-1</sup> fungicida sistémico CERFUTRIN 70 PH® (Tiofanato de metilo), en combinación con 2 ml L<sup>-1</sup> del fungicida de contacto CAPTAN 80 WG®.</p>	<p>Modificado 10 % + Fungicida + Coco</p>	
	<p>Pasado el tiempo se realizaron 4 enjuagues con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar marca LabTech®, modelo LCB-1202H, posterior a esto los explantes fueron tratados por 5 segundos en constante agitación con HgCl<sub>2</sub> en una concentración del 0.025 %, se retiraron excesos del HgCl<sub>2</sub> con 4 enjuagues de agua estéril y por 10 segundos los explantes se mantuvieron en agitación en una solución de cloro al 0.25 % + tween. Posteriormente, se dieron otros 4 enjuagues con agua desionizada y estéril, se dejaron las yemas axilares por 5 segundos en alcohol al 50 %.</p>		

**Cuadro 4. Continuación.**

6	El protocolo de desinfección usado fue el propuesto por la metodología descrita en la quinta siembra.	MS Modificado 100 % + Fungicida + Coco MS Modificado 70 % + Fungicida + Coco MS Modificado 40 % + Fungicida + Coco MS Modificado 10 % + Fungicida + Coco	Sin presencia de contaminación u oxidación.
---	---	---	---

El efecto del cloro en concentración y tiempos de exposición, indico en la quinta y sexta siembra diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el periodo y tiempo de vida de los explantes (Cuadro 5), ya que al reducir la concentración al 0.25% de cloro y un tiempo de exposición de 5 segundos, el periodo de vida aumenta. Resultados que difieren por los reportados por Jericó et al. (2015), Menchaca (2011) Spinoso (2013), donde utilizaron el cloro para la desinfección de vainilla en una solución de al menos 30%, con tiempos de exposición que oscilan entre los 15 minutos. Sin embargo, Azofeifa et al. (2019), en un trabajo de desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfo-genético de vitroplantas de vainilla *Andrews*, utilizó una concentración de cloro al 0.35% durante 20 minutos en agitación constante, obteniendo resultados favorables.

**Cuadro 5. Periodo de vida de explantes de *V. planifolia* G. Jackson y muerte por oxidación.**

Siembra	Media (Días)	Agrupamiento tukey
1	7	c
2	20.25	c
3	21.25	b
4	25	b
5	39.75	a
6	39.75	a

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (tukey  $\leq 0.05$ ).

El bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) permitió completar el proceso de desinfección en los explantes ya que, al incluir este componente en el tren de desinfección, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la quinta y sexta siembra, registrando periodos de vida más largos con explantes sanos y viables (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Periodo de vida de explantes de *V. planifolia* G. Jackson y muerte por contaminación.**

Siembra	Media (Días)	Agrupamiento tukey
1	0	b
2	15	b
3	16	b
4	17.75	b
5	38	a
6	38	a

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (tukey  $\leq 0.05$ ).

En relación a esto, Azofeifa et al. (2019) afirman que, independientemente del desinfectante usado en el invernadero, la solución desinfectante utilizada en el laboratorio que reduce en mayor grado la contaminación por microorganismos en explantes de vainilla es en bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ), así mismo, reporta que los explantes desinfectados en laboratorio con  $\text{HgCl}_2$  presentan una longitud en las raíces 21% mayor, en contraste con la desinfección con cloro ( $\text{NaClO}$ ).

El bicloruro de mercurio como agente desinfectante en el cultivo in vitro de vainilla, se ha generalizado en muchos laboratorios del mundo (Geetha y Shetty, 2000; Kalimuthu *et al.*,

2006; Janarthanam y Seshadri, 2008; Divakaran y Babu, 2009; Tan *et al.*, 2011; Renuga y Saravana-Kumar, 2014).

El efecto del 6-bencilaminopurina (BAP), el cual es un regulador de crecimiento de la clase de las citoquininas, registro diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la cuarta siembra, presentando aparentemente un efecto contraproducente cuando se le incluyo al medio de cultivo, ya que disminuyo el periodo de vida de los explantes (Cuadro 7), resultado que difiere con lo descrito por Condemarin et al. (2007) quienes reportan que a 2 ppm de BAP, los explantes de plántulas del genero *Orchidaceae* desarrollan un mayor número de yemas axilares, en comparación a otras concentraciones.

**Cuadro 7. Periodo de vida de explantes de *V. planifolia* G. Jackson y al incluir 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo.**

Siembra	Media (Días)	Agrupamiento tukey
1	7	b
2	25.5	b
3	30.75	a
4	26	b
5	43	a
6	43	a

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (tukey  $\leq 0.05$ ).

Otros investigadores mencionan que en los medios de cultivo debe haber concentraciones balanceadas de Auxinas y Citocininas para obtener efectos favorables de brotes radicales y apicales, dichas concentraciones deben estudiarse para cada especie o variedad (Krikorian, 1991)

El agua de coco al incluirse en los medios de cultivo, de manera general, se observaron efectos positivos en el desarrollo de los explantes, lo cual coincide con las investigaciones de Gomes de Araujo et al. (2006) quienes indican que al adicionar 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco al medio de cultivo, se promueve un mayor desenvolvimiento en el cultivo *in vitro* de plántulas de orquídeas.

En orquídeas terrestres de los géneros *Habenaria* y *Ophrys* se ha evidenciado el efecto positivo del agua de coco en el medio de cultivo, en término de formación y desarrollo de los protocormos (Stewart y Kane, 2006; Kitsaki *et al.*, 2004).

Los efectos promotores del agua de coco se deben a la presencia de compuestos orgánicos como citoquininas, zeatinas, kinetinas y purinas, que se consideran promotores del crecimiento vegetal (Yong et al., 2009; Hicks, 2007).

En la composición del agua extraída de cocos verdes, los fitoreguladores presentes son citoquininas, con un total de 10 compuestos, seguidas por dos giberelinas y una auxina (Yong et al., 2009), las citoquininas juegan un papel fundamental en la organogénesis vegetal, ya que inducen la formación de hojas y brotes y aumentan la velocidad de desarrollo y la germinación de la semilla (Werner et al., 2001; Huan et al., 2004).

En general el tiempo de vida de los explantes fue variable en las siembras, en su mayoría, los explantes no reactivaron la brotación de raíces y ápices, posiblemente debido a la edad fisiológica de las yemas al momento de colecta en campo, en relación con esto INIFAP (2013) menciona que la calidad de los explantes influye en la morfogénesis, mientras más joven sea el tejido, la micropropagación tendrá una mayor posibilidad de resultar exitosa, por ello se selecciona el material vegetal en óptimas condiciones fisiológicas y de saneamiento, sin olvidar el balance hormonal que también está asociado al estado de desarrollo del material vegetal, así mismo, Frausto et al. (2019) indican que la calidad de las plantas donadoras es un factor crítico que afectará el rendimiento del cultivo *in vitro*, por lo que, es conveniente estandarizar las condiciones de crecimiento previas al establecimiento aséptico, para asegurar la calidad de los explantes, los principales aspectos que se deben considerar son luz, temperatura, riego, fertilización y humedad, además de hacer constantes revisiones para eliminar plagas o enfermedades.

El periodo de siembra, a la aparición de raíces y rebrotes en vainilla, regularmente es de 30 días (Lozano et al., 2015). En el presente trabajo, el periodo de vida de los explantes sin contaminación y oxidación fue hasta los 45 días después de la siembra. Sin embargo, la aparición de raíces y rebrotes ha sido muy retardada.

En relación a la concentración en los medios de cultivo utilizados, se observa un efecto en los días que tardaron en contaminarse los explantes, ya que el tratamiento al 40% de MS fue el que retarda por más tiempo la aparición de hongos contaminantes en el medio de cultivo (Cuadro 8), en comparación con los demás tratamientos, dichas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 8. Periodo de vida de los explantes *V. planifolia* G. Jackson considerando diferentes concentraciones de MS.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Media (Días)</b>	<b>Agrupamiento Tukey</b>
<b>T1</b>	16.66	c
<b>T2</b>	20.167	c
<b>T3</b>	37.667	a
<b>T4</b>	32.667	b

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (tukey  $\leq 0.05$ ).

Frausto et al. (2019) reportan en orquídeas mariposa mayor viabilidad de los explantes al utilizar en el medio de cultivo MS al 50% y concluyen que las sales minerales empleadas en los medios de cultivo, así como la variedad de orquídea, influyen significativamente en la oxidación de los explantes.

Así mismo, Jericó et al. (2015), demostraron que es posible lograr la inducción de brotes al utiliza un medio MS al 50% sin reguladores del crecimiento en un sistema de biorreactores para el cultivo de vainilla.

Lo cual da soporte a los resultados obtenidos en el experimento.

### **6.3. Reproducción *in vitro* de subcultivos en *V. planifolia* G. Jackson**

El comportamiento de los explantes de *V. planifolia* provenientes de subcultivos fueron diferentes a los explantes de campo, esto debido a que los explantes provenientes de campo fueron afectados significativamente por problemáticas comunes en la reproducción *in vitro*, como lo son la contaminación y la oxidación.

En lo particular, la vainilla, está asociada con diferentes tipos de hongos tanto endógenos como exógenos que permiten el desarrollo y supervivencia de la planta en campo. Sin embargo, debido a diversos factores como la mutación, un cambio en el ambiente, el estado nutricional o la edad de la planta, los hongos pueden convertirse en agentes contaminantes en los medios de cultivo *in vitro* (Lana et al., 2011).

Los explantes provenientes de campo tardaron alrededor de 45 días después de la siembra en reactivar la diferenciación de tejidos en raíces y tallos; en comparación con los explantes provenientes de subcultivos, los cuales no llegaron a presentar problemas de contaminación u oxidación tardando alrededor de 11.57 días después de la siembra en diferenciar sus tejidos en tallos y raíces.

El comportamiento del desarrollo de los explantes de subcultivos en diferentes medios de cultivo, fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ), debido a que T1 presentó la mayor longitud de tallo con 2.68 centímetros, seguido de T2 con 2.44 centímetros, siendo la diferencia entre estos la adición del agua de coco en el medio de cultivo de T1. De la misma manera, T5 presentó un desarrollo de longitud de tallo intermedio con 1.92 centímetros. Así mismo, los tratamientos T3, T4, T6, T7 y T8, presentaron una longitud estadísticamente igual y dentro de este grupo T8 fue el que presentó la menor longitud de tallo con 0.4 centímetros, posiblemente por contener los niveles más bajos de MS (10%) aunados a la ausencia de agua de coco (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Desarrollo de subcultivos de explantes de *V. planifolia* G. Jackson**

<b>Tratamiento</b>	<b>Longitud del tallo (cm)</b>	<b>Numero de raíces</b>	<b>Longitud de raíces (cm)</b>	<b>Numero de hojas</b>
<b>T1</b>	<b>2.68a</b>	<b>2a</b>	1.10 <sup>a</sup>	<b>1.8a</b>
<b>T2</b>	2.44a	1.6a	<b>1.3<sup>a</sup></b>	1.6a
<b>T3</b>	<b>1.08c</b>	<b>1a</b>	0.12c	0.6a
<b>T4</b>	0.92c	0.6a	<b>0.21c</b>	<b>0.8a</b>
<b>T5</b>	<b>1.92b</b>	<b>1.8a</b>	<b>0.52b</b>	<b>2a</b>
<b>T6</b>	0.52c	0.6a	0.14c	0.6a
<b>T7</b>	<b>1.26c</b>	<b>1.6a</b>	<b>0.29c</b>	<b>1.2a</b>
<b>T8</b>	0.4c	1a	0.18c	0.8a

\*T1= MS y sacarosa al 100 % con coco; T2= MS y sacarosa al 100 % sin agua coco; T3= MS y sacarosa al 70 % adicionado con coco; T4= MS y sacarosa al 70 % sin agua coco; T5= MS y sacarosa al 40 % sin agua coco; T6= MS y sacarosa al 40 % con coco; T7= MS y sacarosa al 10 % con coco; T8= MS con sacarosa al 10 % sin agua coco.

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (tukey  $\leq 0.05$ ).

Los subcultivos de *V. planifolia* del T3 de (MS y sacarosa al 70 % adicionado con agua de coco) fueron los que presentaron un mayor periodo de tiempo después de la siembra para la diferenciación de tejidos en tallo, con un promedio de 18.3 días después de la siembra, seguido por el T2 (MS y sacarosa al 100 % sin agua coco) con un promedio de 14.4 días después de la siembra, el T2 (MS y sacarosa al 70 % sin agua coco) con un promedio de 14 días después de la siembra, el T1 (MS y sacarosa al 100 % con coco) con un promedio de 10.6 días después de la siembra, de manera similar, los tratamientos T5 y T6 (MS y sacarosa al 40 % sin coco; MS y sacarosa al 40 % con coco) presentaron un promedio de 9.6 días después de la siembra, el T7 (MS y sacarosa al 10 % con coco) presentando un promedio de 10.6 días después de la siembra y el T8 (MS con sacarosa al 10 % sin coco) fue el que presentó un menor periodo de tiempo después de la siembra para la diferenciación de tejidos en tallo, con un promedio de 7 días después de la siembra. Cabe mencionar que los explantes cuyo tratamiento contuvo una cantidad de MS y Sacarosa al 100 % y 70 %, en comparación con los tratamientos al 40 % y 10 %, presentó un periodo de tiempo mayor después de la siembra para la diferenciación de tejidos en tallo.

En relación a la longitud de tallo, se observa una tendencia a presentar mayores valores cuando en el medio de cultivo se tiene un 100 % de MS más agua de coco, lo que indica que los explantes necesitan la mayor cantidad de nutrientes en el medio y el agua de coco, por contener un total de 10 compuestos orgánicos como citoquininas, zeatinas, kinetinas y purinas, seguidas por dos giberelinas y una auxina juega un papel fundamental en la formación de hojas y brotes, aumentando la velocidad de desarrollo (Werner *et al.*, 2001; Huan *et al.*, 2004; Hicks, 2007; Yong *et al.*, 2009).

En cuanto al número de raíces (Cuadro 9), no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, se observa que numéricamente hay una tendencia a tener mayores valores cuando se adiciona agua de coco al medio de cultivo.

El promedio del desarrollo de raíces para todos los tratamientos fue de 14.44 días después de la siembra, por otro lado, los subcultivos de *V. planifolia* del T2 (MS y sacarosa al 100 % sin coco) fueron los que presentaron un periodo de tiempo mayor después de la siembra para la diferenciación de tejidos en raíces, presentando un promedio de 25.8 días después de la

siembra, así mismo, el T5 (MS y sacarosa al 40 % sin coco) fueron los que presentaron un menor periodo de tiempo antes de la formación de raíces, presentando un promedio de 2 días después de la siembra.

En longitud de raíces T1 presento un comportamiento diferente a la variable de longitud de tallo, ya que fue el T2 el que presento mayores valores, con una longitud de raíces de 1.3 centímetros, seguidos por T1 con 1.1 centímetros. Así mismo, todos los tratamientos presentaron un comportamiento estadísticamente similar ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, fueron T3, T6 y T8 los que presentaron los menores valores con 0.12, 0.14 y 0.18 centímetros de longitud respectivamente.

En los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se observa que los valores fueron menores cuando se adiciono agua de coco en el medio de cultivo. Sin embargo, en T5, T6, T7 y T8, el comportamiento fue diferente, ya que, al adicionar agua de coco al medio de cultivo, se obtuvieron valores mayores. Lo cual indica que el agua de coco puede no tener algún tipo de efecto en la longitud de raíces.

En cuanto a raíces, Azofeifa et al. (2019) realizaron evaluaciones a lo largo de dos meses en explantes de *V. planifolia Andrews*, obteniendo con una combinación de kilol-HgCl<sub>2</sub> un 37 % más raíces, obteniendo un promedio de 4.68 raíces, así mismo, indica que esta combinación, incrementó hasta un 47 % más el tamaño de las raíces, obteniendo así un promedio de 4.9 raíces.

En el presente trabajo, los valores en longitud de raíces, obtenidos en los subcultivos, están por encima de los resultados obtenidos en investigaciones donde se complementaron los medios con auxinas. Giridhar et al. (2003) reportan que al complementar el medio MS con 2 mg/l BAP + 1 mg/l AFA se obtuvo  $1,04 \pm 0,25$  cm después de sesenta días de evaluación. Sin embargo, investigadores como Zuraida et al. (2013), después de treinta días de evaluación, obtuvieron en medio MS,  $4,01 \pm 0,22$  cm y  $4,42 \pm 0,2$  al complementar el medio MS con 1 mg/l de ANA (Tan et al., 2011), de la misma manera, tras un periodo de observación de 45 días, Janarthanam y Seshadri (2008) obtuvieron  $6,37 \pm 1,10$  cm en crecimientos de raíces al complementar el medio con 1 mg/l de AIA + 0,1 mg/l de ANA, mientras que Giridhar et al. (2001) obtuvieron  $8,5 \pm 2,07$  cm con el uso de 2 mg/l de AIB.

En relación al número de hojas, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, numéricamente T1 fue el que presento un mayor número de hojas,

con 1.8 hojas, seguido por T2, T3, T6 y T8, quienes presentaron los valores más bajos, con 0.6, 0.6 y 0.8 respectivamente.

El promedio del desarrollo de hojas para todos los tratamientos fue de 15.22 días después de la siembra, por otro lado, los subcultivos de *V. planifolia* de T8 (MS y sacarosa al 10 % sin coco) fueron los que presentaron un periodo de tiempo mayor después de la siembra para la diferenciación de hojas, presentando un promedio de 30 días después de la siembra, así mismo, el T5 (MS y sacarosa al 40 % sin coco) fueron los que presentaron un periodo de tiempo menor después de la siembra para la formación de hojas, presentando un promedio de 5.6 días después de la siembra.

Se observa que en la mayoría de los tratamientos el agua de coco presento un efecto positivo, ya que hubo una tendencia de presentar un mayor número de hojas.

## VII. CONCLUSIONES

- El tratamiento al 40% de MS y sacarosa, retardo la aparición de hongos contaminantes en el medio de cultivo.
- Los procesos de desinfección con variantes en la exposición de los explantes provenientes de campo, tanto en tiempo como en concentración al cloro, alcohol y bicloruro de mercurio permitieron alargar el periodo de vida de los explantes de *V. planifolia* G. Jackson.
- El agua de coco al incluirse en los medios de cultivo usados en subcultivos de *V. planifolia* G. Jackson presento efectos positivos, al influir principalmente en la formación de tallos y raíces.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abebe, Z., A. Mengesha, A. Teressa, and W. Tefera. 2009. Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African J. Biotechnol.* 8:6817-6821
- Acuña Z. M. T. 2016. Optimización de la multiplicación *in vitro* de *Cattleya dowiana bateman* (1866) en sistemas de cultivo líquido y de inmersión temporal. Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. 58 p.
- Adame, G. J.; A. R. Trigos L.; L. G. Iglesias A.; N. Flores E.; M. Luna R. 2011. Variaciones isoenzimática y patogénica de *Fusarium spp.* Asociadas con la pudrición de tallo y raíz vainilla. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13 (3): 299-306
- Alatorre C. F. 2002. Estudio morfogénico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona* Schiede obtenido *in vitro*. Tesis. Bach. Agr. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 86p
- Anlew L. 1974. Posibilidades del cultivo de la vainilla en Guatemala. Ciudad de Guatemala. 215p
- Azofeifa B. J. B.; G. Rivera C.; A. Paniagua V.; R. Cordero S.; E. Salas A. 2019. Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogenético de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana*. 30(1):33-49
- Azofeifa J., Paniagua A. García J. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25 189202
- Bello B. J. J.; G. G. García G.; L. Iglesias, A. 2015. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 38 (2): 165-171
- Brownell, R. 2006. State of industry: 2006 and beyond. Forecasting opportunities and threats on road to recovery. *Perfumer and Flavorist* 31:24-37.
- Carrillo B. M. G.; L. Rodríguez J.; J. G. Álvarez M. 2011. Morfogénesis *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* var. *Glauca*. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 17 (2): 273-282
- Castillo A. 2015. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología. INIA Las Brujas. 8 p.

- Cibrián J. A. 2013. Variación genética de *Vanilla Planifolia* en México. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM, México. PP 120.
- Condemarín M. C. E.; J. Chico-Ruíz.; C. Vargasartaega. 2007. Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo in vitro de yemas axilares de *Encyclia microtos (rchb.f.) hoehne (Orchidaceae)*. Lankesteriana International Journal on Orchidology. 1(1-2): 247-254
- Cordero F. 1986. El cultivo de la vainilla. Costa Rica. Guía agropecuaria. 4:49-54
- Coro A. 2009. La crisis de los polinizadores. Biodiversitas. 85 p.
- Dressler, RL. 1993. The Orchids: Natural history and classification. Cambridge, Massachusetts, US, Harvard University Press. 322 p.
- Dequaire J. 1976. L'amelioration du Vaniller a Madagascar. Journal Agriculture Tropicale et Botanique Appliquee. 23:12-13.
- Divakaran M., y K. N. Babu. 2009. Micropropagation and in vitro conservation of vanilla (*Vanilla planifolia Andrews*). En: S.M. Jain, and P.K. Saxena, editors, Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ, USA. PP 129-138.
- Divakaran M.; Babu N.; Ravindran P. N.; Peter K. V. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. Scientia Horticulturae. 108:414-422.
- Dunphy P.; Bala K. 2010. Review: A flavor of *Vanilla*. Aroma, taste and mouthfeel. Perfumer & Flavorist. 35:42-48.
- EcuRed. 2017. Contaminación microbiana *in vitro* (Tejidos vegetales) [EN LINEA]. [https://www.ecured.cu/Contaminaci%C3%B3n\\_microbiana\\_in\\_vitro\\_\(Tejidos\\_vegetales\)](https://www.ecured.cu/Contaminaci%C3%B3n_microbiana_in_vitro_(Tejidos_vegetales)) Consultado en Febrero del 2019.
- Etienne H.; Berthouly M. 2002. Temporary immersion system in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 215-231.
- FAO. . 1995. Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos de América Central y México. Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos fitogenéticos. San José, Costa Rica.

- Flores H. L. A.; A. Robledo P.; M. J. Jimarez M. 2017. Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8 (6): 1315 – 1328
- Frausto J. K. A.; M. C. Ojeda Z.; O. G. Alvarado G.; E. A. García Z.; H. Rodríguez F.; G. Rodríguez P. 2019. Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 10 (6): 1207 – 1218.
- Gamboa G. M. A. 2014. Vainillas colombianas y su microbiota. II. Diversidad, cultivo y microorganismos endófitos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. *Universitas Scientiarum*. 19(3): 287-300
- Gätjens B. O.; W. Montero C. 2012. Desarrollo de una nueva metodología de transformación genética no tradicional, como estrategia potencial para inducir resistencia a infecciones fúngicas en vainilla (*Vanilla planifolia*). Instituto Tecnológico de Costa Rica Sede San Carlos. Escuela de Ciencias y Letras. 29 p.
- Geetha S.; S. A. Shetty. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Curr. Sci.* 79:886-889.
- Giridhar, P., D.V. Ramu, and G.A. Ravishankar. 2003. Phenyl acetic acid-induced *in vitro* shoot multiplication of *Vanilla planifolia*. *Trop. Sci.* 43:92-95. doi:10.1002/ts.96
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. England, Exegetics Ltd. Edington Wilts. 574p
- George E.; Hall M.; De Klerk G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture* (3 ed.). Dordrecht: Springer.
- Gomes de Araújo A.; P. Moacir.; F. Villa.; F. Carvalho, C. 2006. Agua de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. *Revista Ceres*. 53(310): 608-613.
- González L. K. S. 2013. Respuesta de tres explantes de vainilla (*vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Instituto tecnológico de costa rica. Escuela de biología. Informe de practica de especialidad. 67 p.
- Guerra A., F. 1992. Caracterización morfológica de 10 introducciones de vainilla (*Vanilla* sp.). Tesis. Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Santa Clara, Costa Rica. 38 p.

- Havkin F. A.; Belanger F. C.; Booth D. Y.; Galasso K. E.; Tangel F. T.; Hernández C. J. 2011. A comprehensive study of composition and evaluation of vanilla extracts in us retrieval stores. Handbook of vanilla science and technology. Blackwell Publ. Reino Unido. PP: 220 – 234.
- Herrera-Cabrera B.E., Salazar-Rojas V.M., Delgado-Alvarado A., Campos-Contreras J., Cervantes-Vargas J. 2012. Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. European Journal of Environmental Sciences 2:37-44.
- Hicks A. J. 2007. Orchid seed germination media, a compendium of formulations. The Orchid SeedBank Project, Chandler, USA. 210 p.
- Huan L. V. T.; Takamura T.; Tanaka M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid*. Plant Sci. 166:1443 - 1449.
- INAFED. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Rural. 2019. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, Puebla, Teziutlán. [EN LINEA]. [Siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21174a.html](http://Siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21174a.html). Consultado en Abril del 2019.
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras. 2013. Metodo para el establecimiento *in vitro* de Caoba (*Swietenia macrophylla*) King a partir de explantes vegetativos. Manual técnico número 10. CENID-COMEF, INIFAP. Mexico, DF. Mexico. 84 p.
- Janarthanam B.; S. Seshadri. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 44:84-89
- Jericó J. J.; J. Bello-Bello.; J. Spinoso-Castillo.; L. G. Iglesias-Andreu. 2015. Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). Agroproductividad. PP 63-68.
- Jiménez F. 1990. Evaluación de características morfológicas en desarrollo vegetativo de 10 introducciones de vainilla (*Vanilla* sp). Alajuela, Costa Rica. PP 1 - 53.
- Kalimuthu K.; R. Senthilkumar; N. Murugalatha. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – atropical orchid. Curr. Sci. 91:1401-1403.

- Kitsaki C.; Zigouraki S.; Ziobora M.; Chintziest S. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.* 23: 284-290.
- Krikorian A. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Roca, W. and Mroginski, L. (Ed.). In: cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. Capítulo 3. PP 48-77.
- Kuan C.; Ospina I. 1990. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos. Departamento Técnico Agropecuario. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica. 86 p.
- Lana, T. G.; Azevedo, J. L.; Pomella, A. W.; Monteiro, R. T.; Silva, C. B.; y Araújo, W. L. 2011. Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genetica Molecular*.10: 326 – 334
- León J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial ICA. San José, Costa Rica. PP 127
- Lozano R. M. A. 2014. Establecimiento del banco de germoplasma *in vitro* de vainillas mexicanas. Centro de Investigaciones Tropicales. 100 p.
- Lozano R. M. A.; R. A. Menchaca G.; J. L. Alanis M.; J. M. Pech C. 2015. Cultivo in vitro de yemas axilares de vainilla planifolia Andrews con diferentes citocininas. *Revista científica biológico agropecuaria Tuxpan.* 4(6): 1153 – 1165.
- Lubinsky, P; Bory, S; Hernández H, J; Seung-Chul, K; Gómez-Pompa, A. 2008. Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Orchidaceae). *Economic Botany* 62(2):127– 138.
- Malabadi R. B.; Nataraja K. 2007. Genetic transformation of *Vanilla planifolia* by *Agrobacterium-tumefaciens* using shoot tip sections. *Research Journal of Botany.* 2:86-94
- Menchaca G. R. A. 2011. Obtención y caracterización morfológica de híbridos de *Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews y *V. pompona* Schiede. Tesis de Doctorado en Ecología Tropical, Centro de Investigaciones Tropicales. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. Mexico.

- Moreno F.; M. Díez. 2011. Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Mujar, E.K., N.J. Sidik, N.A. Sulong, S.S. Jaapar, and M.H. Othman. 2014. Effect of low gamma radiation and methyl jasmonate on *Vanilla planifolia* tissue culture. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 27:163-167.
- Murashige T.; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.* 15: 473 - 497
- Navarro W.; Perea M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. Editorial de la Universidad Nacional (EUNA). Heredia, Costa Rica. 105 p
- Ordóez C.N.F.; J. Tupac O.; M. C. Díez G. 2012. Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. *Acta Agronómica.* 61(3): 282-290.
- Padilla V.J. 2016. Análisis nutrimental en tejido foliar y radicular de *Vanilla Planifolia* cultivada en un cacaotal diversificado. Congreso Internacional de Vainilla. Sistemas agroforestales y productos no maderables del bosque. INISEFOR / UNA.
- Parra Q. 1987. Cultivo *in vitro* y anatomía de óvulos de vainilla (*Vainilla planifolia* Andrews). Tesis. M.Sc. Fruticultura. Colegio de Post graduados. Chapando. México. 104 p.
- Philip V. J.; Nainar A. Z 1988. Structural changes during the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Annals of Botany.* 61(2):139-146.
- Renuga G.; S. N. Saravana-Kumar. 2014. Induction of vanillin related compounds from nodal explants of *Vanilla planifolia* using BAP and Kinetin. *Asian J. Plant Sci. Res.* 4(1):53-61.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion. 2017. Vainilla Mexicana. 16 p.
- Salazar M. A. S.; Amaya N. Z. A.; Barrientos R. F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15: 97-105.
- Sarukhán J.; Carabias J.; Koleff P.; Urquiza T. 2012. Capital natural de México: Acciones estratégicas para su valoración, preservación y recuperación. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 95 p.

- SEMARNAT. 2010 Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) de Protección especial de especies nativas de México de Flora y Fauna silvestres, Diario Oficial de la Federación, 31 de Dic. 2010.
- Sharma V. 2012. Regenerative Competence in root explants of *Cattleya* hybrid, an endangered genera: A study *in vitro*. International Journal of Scientific and Research Publications. 2: 1-3
- SINAREFI. Sistema Nacional de Recursos Fitogeneticos para la Alimentación y la Agricultura. Publicado en: Marzo 2014. Ornamentales. Red Orquídeas. Antecedentes [EN LINEA] [http://www.sinarefi.org.mx/redes/red\\_orquideas.html#cajaAnte](http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_orquideas.html#cajaAnte). Consultado en Febrero de 2019.
- Soares J. D. R.; Pasqual M.; A. Rodrigues F.; Araujo A. 2010. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativa e híbrida. Universidade Federal de Santa María. Santa María, Brasil. *Ciência Rural*. 40 (9): 1941 - 1947
- Soto A. M. A. 1999. Fitogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Informe final SNIBConabio, proyecto J101. México D. F.
- Soto A. M. A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. *Biodiversitas* PP: 66 - 19
- Soto A. M. A. 2003. *Vanilla* (tratamiento genérico), en A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase y F.N. Rasmussen (eds.), *Genera Orchidacearum*, Oxford University Press. *Orchidoideae (part two) Vanilloideae*. 3: 321 - 334.
- Soto A. M. A. y Cribb P. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex Mill. (*Orchidaceae: Vanillinae*). *Lankesteriana*. 9 p.
- Spinoso C. J.; Pérez S. J.; Bogdanchikova N.; Bello B. J. J. 2013. Respuesta antimicrobiana de nanopartículas de plata sobre la regeneración *in vitro* de vainilla (*vanilla planifolia*). Colegio de Postgraduados. 6 p.
- Stewart S. y Kane M. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (*Orchidaceae*), a rare Florida terrestrial orchid plant. *Cell. Tiss. Organ Cult*. 86:147-158.
- Sulvaran A. I. G. 2018. Radiosensibilidad en vitroplantas de Vainilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) en fase inicial con <sup>60</sup>Co. Tesis profesional. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. San Juan Acateno, Teziutlan. 46 p.

- Tai A.; Sawano T.; Yazama F.; Ito H. 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using antioxidant assays. *Biochim. Biophys. Acta.* 1810:170-177.
- Tan B. C.; C. F. Chin; P. Alderson. 2011. An improved plant regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 21:27-33.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Plant physiology*. 4th (Ed.). Sinauer Associates, Inc. USA. 410-412 pp.
- Tudela H. 2013. Propagación de *Cattleya rex* en cultivo *in vitro*. Tarapoto. Marx, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. Vol. 59. PP. 153–163.
- Vilchez J.; Y. Rivas; N. Albany; M. Molina; L. Martínez. 2009. Efecto de la N<sup>6</sup>-bencilaminopurina sobre la multiplicación in vitro de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 26 (3): 212-222.
- Werner T.; Motyka V.; Strnad M.; Schmulling T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 10487-10492.
- Yong J. W.; Ge L.; Ng Y. F.; y Tan S. N. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14:5144 - 5164.
- Zuraida, A.R., K.H.F. Liyana, O.A. Nazreena, W.S. Wan-Zaliha, C.M.Z. Che-Radziah, Z. Zamri, and S. Sreeramanan. 2013. A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of *Vanilla planifolia*. *Am. J. Plant Sci.* 4:1685-1692. doi:10.4236/ajps.2013.49205



**BUAP**

**Oficio No. IAH/832/2019**

**Asunto:** Impresión de Tesis.

**C. Mitzy Tiare Arenas Santos**  
**Egresada de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica**  
**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**PRESENTE**

Con base en el dictamen emitido por el Dr. Delfino Reyes López (**Director de Tesis**), Dr. Luis Antonio Domínguez Perales (**Asesor**) y Dra. Carmela Hernández Domínguez (**Asesora**), en su calidad de Consejo Particular, se autoriza la impresión de la tesis titulada:

**“Optimización de un medio de cultivo para la vitropropagación de  
Vanilla planifolia G. Jackson”**

Correspondiente a la Licenciatura en Ingeniería Agrohidráulica.

Sin otro particular por el momento me despido de Usted.

**Atentamente**

“Pensar bien, para vivir mejor”

San Juan Acateno, Teziutlán, Pue., a 21 de noviembre de 2019

**Dr. Armando Ibáñez Martínez**  
Director de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica



c.c.p.- Archivo y Minutario  
DR. AIM/gra.