

870106

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA  
INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
ESCUELA DE BIOLOGIA

MICROPROPAGACION DE *Vanilla planifolia* A.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

ELSA MARIA CERVERA BACKHAUSS

GUADALAJARA, JAL. 1982.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## 1. INTRODUCCION

## 2. REVISION BIBLIOGRAFIA

2.1 Taxonomía y descripción botánica de la vainilla

2.2 Antecedentes históricos e importancia económica

2.3 Habitat y distribución geográfica en México

2.4 Métodos convencionales de propagación

2.5 Propagación in vitro de las orquídeas

## 3. MATERIALES Y METODOS

## 4. RESULTADOS

4.1 Material vegetativo

4.2 Contaminación y desinfección del material vegetativo

4.3 Medios de cultivo

4.4 Condiciones de incubación

4.5 Transplante de propágulos

## 5. DISCUSION

## 6. CONCLUSIONES

## 7. RESUMEN

## 8. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Vanilla planifolia A. es una orquídea de cuyo fruto se obtiene la vainilla. esencia muy popular por su sabor y aroma en las industrias alimenticias y farmacéuticas.

Esta planta, originaria del trópico de México, fue llevada a Europa por los españoles, donde se popularizó ampliamente hasta llegar a ser una de las especies americanas más solicitadas en el mundo occidental.

Durante siglos, fue México uno de los principales productores de vainilla. Sin embargo, por múltiples razones, tanto técnicas como socioeconómicas, la producción comenzó a decaer hacia fines de los años cincuenta. En 1958 el área cultivada con vainilla en el país fue de 8,801 hectáreas y la producción de 278 toneladas con valor de 18,883,000.00 pesos. En 1967 la superficie cultivada disminuyó a 2,800 hectáreas, obteniéndose una producción de 100 toneladas con un valor de 10,000,000.00 pesos (Ramírez, 1978). En la actualidad el cultivo de la vainilla se restringe a unas cuantas parcelas familiares en las zonas tropicales de algunos Estados, principalmente en la zona de Papantla, Veracruz, cuya producción no alcanza a cubrir la demanda nacional, ya que incluso en 1975 hubo que importar vainilla (Sánchez, 1980).

Hasta entonces no se había considerado necesario dar impulso institucional y tecnificar la producción de vainilla. Sin em-

bargo, dado que el vainillín, sintético sustituto del producto natural, tiene efectos cancerígenos, se ha dejado su uso que por años reemplazó a la vainilla, incrementándose la demanda mundial de ésta. Debido a esto, y a la fama que tiene la calidad de la vainilla mexicana, se ha considerado la necesidad de tecnificar su cultivo.

Uno de los principales problemas que se tiene en el cultivo de la vainilla, es el de la propagación de la planta, ya que ésta se reproduce vegetativamente a razón de tres plantas por una al año, lo cual tiene los inconvenientes de utilizar mucho material vegetativo, baja producción y que la planta tarda mucho tiempo, tres años, en producir.

Es así, que, con el fin de ayudar a solucionar este problema y considerando los avances y resultados obtenidos mediante el uso de la técnica de propagación asexual in vitro de especies de plantas alimenticias, ameliorantes, forestales, frutales, forrajeras, hortícolas, especias, suculentas, vivaces y ornamentales, especialmente orquídeas (Murashige, 1977), que se pretende buscar la metodología que nos permita propagar clonalmente in vitro plantas de vainilla.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar la metodología de propagación in vitro de la vainilla.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFIA

### 2.1. Taxonomía y descripción botánica de la vainilla

La vainilla es una monocotiledónea de la familia Orchidaceae, perteneciente al género Vanilla, el cual cuenta con más de 100 especies de plantas herbáceas, terrestres, epífitas o enredaderas que crecen en los bosques tropicales de ambos hemisferios (Purseglove, 1979).

La conocida fragancia denominada vainilla se puede obtener del fruto de tres especies: Vanilla planifolia Andrews (Syn. V. fragrans Salisb.), V. pompona Schiede y V. tahitensis Moore, de las cuales la más importante y de mejor producto es V. planifolia A. (Purseglove, 1979)

V. planifolia A. es una planta herbácea, perenne y trepadora que llega a alcanzar alturas hasta de 10-15 m. El tallo es largo, cilíndrico, monopódico o ramificado, succulento y flexible, de 1-2 cm de diámetro, de color verde oscuro y con internudos de 5-15 cm de longitud. Las hojas son alternas, largas y carnosas, oblongo-elípticas a lanceoladas, de 8-25 cm por 2-8 cm, hemipecioladas y paralelinerves. Presenta raíces adventicias aéreas formadas a nivel de los nudos y que sirven a la planta para sostenerse sobre el "tutor" o árbol sostén. Las flores se presentan en número de 20-30 en inflorescencias racimosas simples de 5-8 cm de longitud. Generalmente se abre de una a tres flores a la vez y permanecen abiertas sólo un día. El fruto es

una cápsula conocida comercialmente como vaina de 10-25 cm de longitud y de 8-15 mm en diámetro. Contiene miles de semillas negras de aproximadamente 0.4 mm de diámetro, las cuales son liberadas por dehiscencia longitudinal (Ramírez, 1968; Purseglove, 1979; Sánchez, 1980).

## 2.2 Antecedentes históricos e importancia económica.

La vainilla es originaria del sureste de México, Guatemala y otras regiones de Centroamérica y las Antillas (Purseglove, 1979). Desde épocas precortesianas era recogida por los aborígenes de Michoacán, los moradores de la cuna de la Malintzin y los totónacas de la hoy región de Papantla (Ramírez, 1968). Los aztecas la utilizaban para darle sabor a la cocoa y como moneda. Los españoles gustaron de su sabor y pronto se dieron cuenta de sus posibilidades comerciales, por lo que no tardaron en introducir la en Europa en donde tuvo gran demanda. Como resultado de esta demanda, México aumentó su producción mediante la separación de las plantas y su trasplante a terrenos que reunían condiciones ambientales propicias (Ramírez, 1968).

A principios del siglo XIX se introdujo la vainilla en algunas de las colonias europeas en Oriente, fundamentalmente las islas francesas de Java y Madagascar. A pesar de que la planta se adaptó bien en las zonas tropicales del Viejo Mundo, no producía frutos por falta de polinizadores naturales. La flor de

la vainilla presenta, como todas las orquídeas, una estructura membranosa llamada "rostelo", que separa al órgano femenino del masculino. La polinización natural se lleva a cabo por ciertos insectos, siendo este factor una de las barreras principales para la producción. No fue sino hasta que Edmond Albius, un esclavo de la isla francesa de Reunión, descubrió un práctico método de polinización en 1841, mismo que se utiliza actualmente, que fue posible la producción comercial de la vainilla en el hemisferio oriental (Purseglove, 1979).

Hasta esa fecha era el Estado de Veracruz el único centro productor de vainilla comercial en el mundo, pero ya en 1886 fue aventajado por las nuevas regiones productoras del mundo.

México se conservó dentro de los principales productores de vainilla hasta 1959, ocupando el tercer lugar después de Madagascar y Tahití. Sin embargo, a partir de la década de los sesenta, la producción en el país comenzó a decaer enormemente, llegando incluso en el año de 1975 a importar cerca de 32 toneladas del producto, equivalentes al 49% del consumo nacional (Sánchez, 1980). A pesar de eso conserva la reputación de producir la vainilla de mejor calidad en el mundo (Purseglove 1980).

Actualmente la vainilla se destina a la obtención del extracto, el cual se utiliza en la fabricación de licores, repostería alimentos procesados, refrescos, medicinas y perfumes (Sánchez 1980).

Estados Unidos, que es el principal consumidor de vainilla en el mundo, consume alrededor de 1185 toneladas al año. que representan un 70% de la producción mundial (Sánchez, 1980).

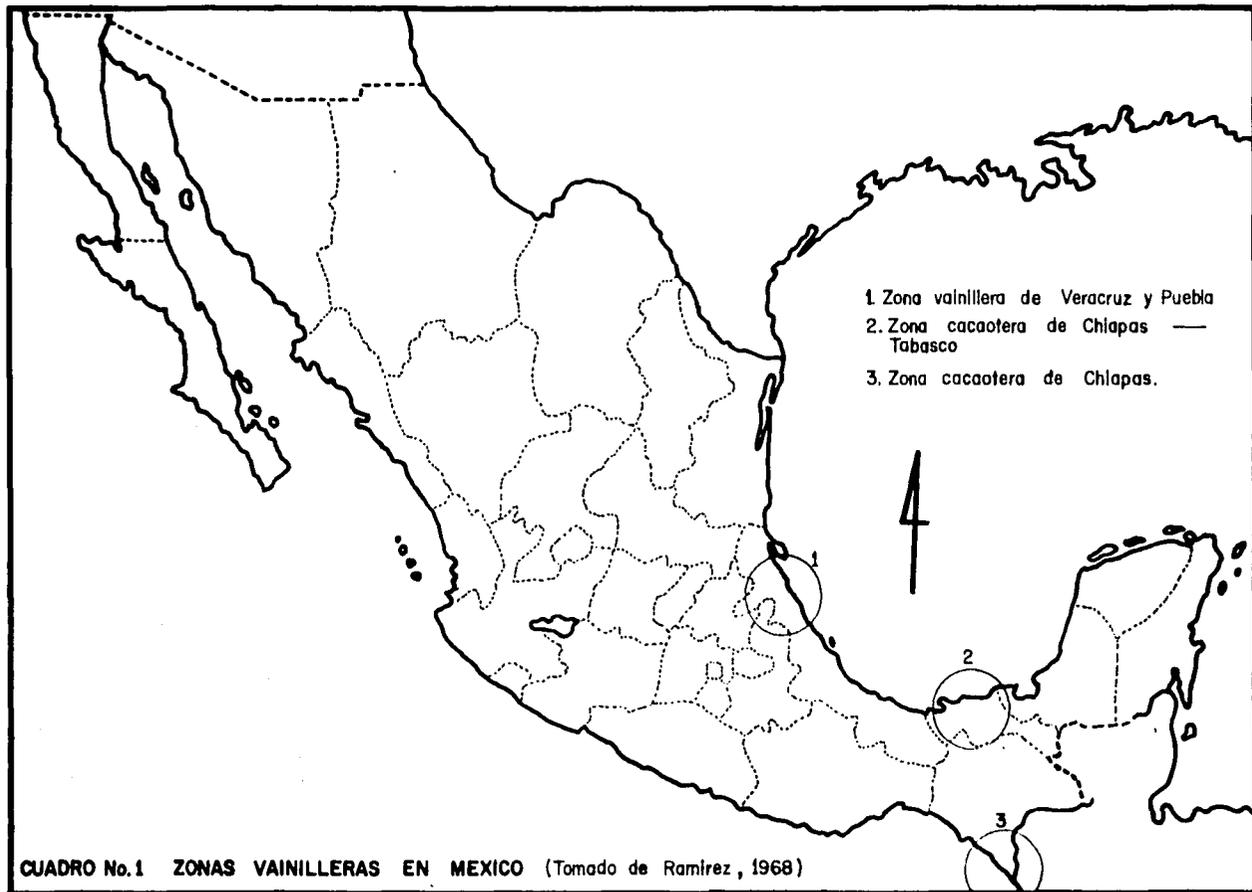
En México el consumo nacional es de alrededor de 45 toneladas, siendo las principales demandantes las empresas Coca-Cola, Herdez y Mc. Cormick (Sánchez, 1980).

### 2.3 Habitat y distribución geográfica en México.

La vainilla se desarrolla en un clima monzónico más o menos tropical, con lluvias frecuentes pero no excesivas. La temperatura óptima varía de 21-32°C con un promedio de 27°C y la precipitación es de 2000-2500 mm anuales con un período de tres meses de sequía durante el año (Purseglove, 1978).

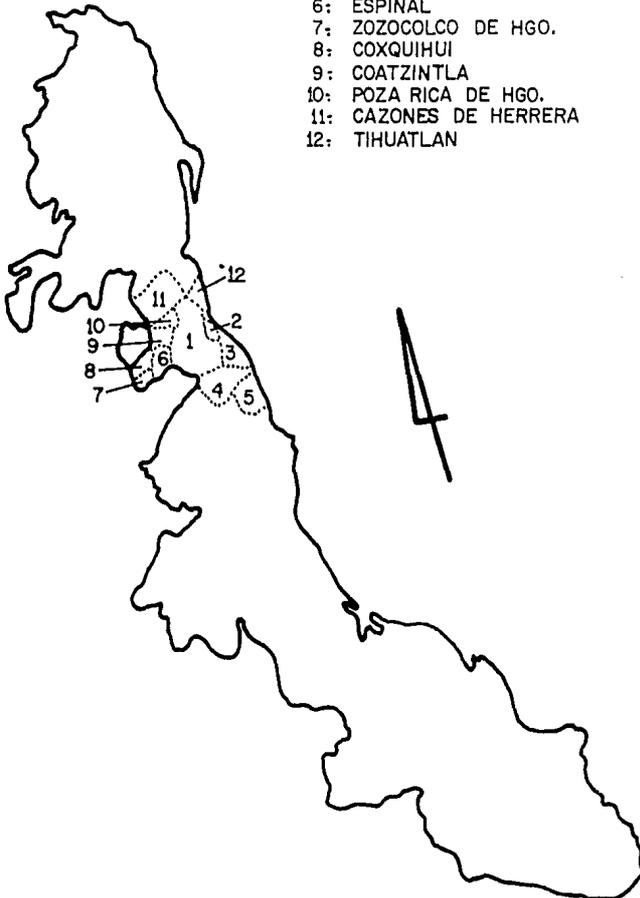
En México, el área de cultivo se localiza en la región de Papantla, la cual se encuentra situada al noroeste del Estado de Puebla y al noroeste del Estado de Veracruz (cuadros 1 y 2). Aunque la región de Papantla es la más importante en el país, la vainilla también se cultiva aisladamente en pequeños municipios de los Estados de Chiapas, Oaxaca, San Luis Potosí y Tabasco (Sánchez, 1980).

Durante los últimos años el área ocupada por el cultivo ha ido decreciendo paulativamente y con ello el cultivo ha ido perdiendo su importancia en la economía nacional. En 1940 existían 32 municipios productores en la región de Papantla, ocupando una superficie de 4,634 hectáreas. Actualmente son sólo



ZONA VAINILLERA DEL EDO. DE  
VERACRUZ LOCALIZADA EN LOS  
MUNICIPIOS DE:

- 1: PAPANTLA DE OLARTE
- 2: GUTIERREZ ZAMORA
- 3: TECOLUTLA
- 4: MARTINEZ DE LA TORRE
- 5: NAUTLA
- 6: ESPINAL
- 7: ZOZOCOLCO DE HGO.
- 8: COXQUIHUI
- 9: COATZINTLA
- 10: POZA RICA DE HGO.
- 11: CAZONES DE HERRERA
- 12: TIHUATLAN



Cuadro No. 2 ZONA VAINILLERA DEL ESTADO  
DE VERACRUZ  
(Tomado de Ramirez, 1968)

8 los municipios los productores de mayor importancia y ocupan un área de 1083 hectáreas, por tanto la reducción en la superficie de cultivo es del orden del 75% (Sánchez, 1980).

#### 2.4 Métodos convencionales de propagación

##### a) Por semilla

La forma de reproducción por semilla no es utilizada en el cultivo de la vainilla, dado que presenta dificultades para su germinación, pero se han hecho varios intentos para obtener plantas que provengan de semilla, con fines de mejoramiento genético (Ortíz, 1945).

En su forma silvestre la vainilla llega a reproducirse por semilla cuando la flor es fecunda de manera natural por abejas del género Melapona, siendo la polinización natural del orden del 1% (Purseglove, 1979).

##### b) Vegetativamente

La vainilla comercial se propaga siempre por medio de estacas, sarmientos o esquejes que son fracciones del tallo de longitudes variables, conteniendo de 6-8 nudos (Cuspinera 1947; Sánchez, 1980). El tamaño del esqueje se determina generalmente de acuerdo a la longitud del material vegetativo disponible, Esquejes cortos de 30 cm de longitud tardan 3-4 años de florear y formar fruto. En algunas regiones se utilizan cuando es

posible, corte de 2-3.5 de longitud, los que, colocando sus extremos libres sobre soportes, tardan de 1 a 2 años en florear y formar fruto. (Purseglove, 1979). En México los esquejes o bejucos se cortan de 50-80 cm de longitud con 4 a 7 nudos. Los bejucos son sembrados al pie del tutor, de 2 a 3 en cada soporte. Para eso se hace una zanja de 5 a 10 cm de profundidad tan larga como la parte del bejuco que se va a enterrar. En cada zurco se coloca un bejuco, procurando que 2 nudos queden enterrados y el resto se doble dándole una dirección hacia arriba y se amarra al tutor para que se sostenga. El bejuco comienza a enraizar a las dos semanas de plantado y a los 30 o 40 días comienza a retoñar. La floración se realiza aproximadamente a los dos años (Sánchez, 1980).

## 2.5. Propagación in vitro de las orquídeas

### a) Generalidades

Las orquídeas son plantas cuya reproducción es sumamente específica, lo cual dificulta su propagación fuera de su medio ambiente. Entre los principales problemas para su propagación se encuentran: la dificultad de polinización fuera del medio ambiente natural; la imposibilidad de obtener material vegetativo homogéneo; la dificultad de seleccionar y estabilizar los caracteres a causa de lo tardado de su desarrollo antes de alcanzar la madurez y reproducirse (Vacherot, 1977).

De allí la necesidad de encontrar métodos que permitieran la propagación vegetativa para obtener gran cantidad de plantas con caracteres genéticos más o menos estables. En 1922, Knudson describió técnicas de cultivo para la germinación de semillas de orquídeas, procedimiento utilizado actualmente en horticultura. Los embriones cuya germinación es tardada por estar en latencia o que abortan al madurar, pueden separarse de la semilla y germinar in vitro (Hartmann, 1975).

A partir de los estudios de Knudson, se generalizó la técnica y así tenemos estudios recientes sobre la germinación de semillas de orquídeas como Bletilla striata (Ichihashi, 1978);

Cattleya, Cymbidium, Phalaenopsis, Eulophidium (Rosa et al, 1977)  
Paphiopedilum (Ernst et al, 1974); Zeuxine strateumatica (Arekal et al 1978).

En 1969 Morel fue el primero en aplicar técnicas de reproducción clonal en las orquídeas, utilizando meristemos apicales de Cymbidium

con el fin de obtener plantas libres de virus a partir de plantas contaminadas (Vacherot, 1977). Lo fundamental de su trabajo consistió en descubrir en las orquídeas la facultad de formar, en un medio aséptico y a partir de células meristemáticas del ápice, una estructura que él denominó "Protocorm-like body", similar al protocormo que representa el primer estadio de desarrollo del embrión (Vacherot, 1977).

Si este "protocormo" es fraccionado, los fragmentos conservan la facultad de generar nuevos protocormos que se diferenciarán

hasta formar una plántula normal, a menos que sean nuevamente fraccionados. Seccionando sistemáticamente a los nuevos protocormos antes de que se diferencien, es posible obtener, a partir de una fuente única, un número ilimitado de plantas (Vacherot, 1977).

A partir de esa fecha se iniciaron numerosos estudios de propagación in vitro en diferentes especies de orquídeas, lo que permitió dar un fuerte impulso al cultivo comercial de las mismas (En el cuadro 3 se muestran las especies que se han propagado in vitro).

#### b) Inóculos

Se denomina inóculo a la pequeña porción de la planta utilizada para iniciar un cultivo in vitro (Hartmann, 1975).

La parte más utilizada como inóculo para la multiplicación vegetativa de orquídeas ha sido la yema apical o ápice vegetativo del tallo. Algunos géneros propagados utilizando como inóculo el ápice vegetativo han sido Aranda (Chang y Hua, 1978); Cattleya

(Champagnat, 1977; Ichihashi, 1973; Rosa et al, 1977; Kusomoto, 1979); Cymbidium (Champagnat, 1977; Wimber, 1963; Rosa et al 1977); Dendrobium (Intuwong y Sagawa, 1974); Eulophidium (Rosa et al, 1977); Odontonia (Champagnat, 1977); Ophrys (Intuwong y Sagawa, 1974; Champagnat, 1977; Rosa et al, 1977); Vanda (Champagnat, 1977).

Las yemas axilares también han sido utilizadas con resultados exitosos, como en Aranda (Goh, 1973); Cattleya (Ichihashi, 1973) Dendrobium (Mosich et al, 1975; Intuwong y Sagawa, 1975 a, b); Dendrophthoe (Ichihashi, 1973); Phalaenopsis (Stewart et al. 1976) En el caso de Epidendrum O'Brienianum (Stewart et al, 1976); Phalaenopsis (Sagawa, 1961) y Vanda (Sagawa y Sehgal, 1967) se utilizaron segmentos de tallo con nudo y yema axilar, obteniéndose crecimiento en aproximadamente dos semanas y formación de hoja y raíz en 6 a 20 semanas, estando listas las plántulas para transplantarse a tierra a las 30 semanas de cultivo.

Otras partes vegetativas de la planta, utilizadas para llevar a cabo la propagación clonal, han sido las hojas, yemas florales rizomas y raíces. En Cattleya se utilizaron hojas embrionarias para la inducción de protocormos. En Aranda (Loh et al, 1975): Dendrobium, Epidendrum y Laeliocattleya (Churchill et al, 1973) se utilizaron ápices foliares para inducir la regeneración, obteniéndose pequeños callos y protocormos. Yemas florales de la región basal de las inflorescencias, se han utilizado como inóculo en Ascofinetia, Neostylis y Vacostylis (Intuwong y Sagawa, 1973); en Dendrophthoe, Phalaenopsis y Vanda (Rotor, 1949; Singh y Sagawa, 1972; Arditti, 1978). También se han intentado utilizar ápices de rizoma, obteniéndose plántulas de Cymbidium goerinzii y C. pumilum (Ueda y Torikata, 1972).

### c) Medios de cultivo

#### c.1. Sales minerales

Martin (1977) menciona que las orquídeas se encuentran entre las especies vegetales que pueden desarrollarse en medios de cultivo muy simples, constituídos por soluciones minerales sencillas como la de Knop o la de Knudson (En el cuadro 3 se enlistan los medios que han sido utilizados en propagación in vitro en diferentes especies de orquídeas).

Se puede observar que los medios más utilizados son el de Knudson y el de Vacin y Went. Sin embargo Rao (1979) muestra que en trabajos realizados para propagar yemas de Cattleya, Miltonia, Odontoglossum y Vanda, se obtuvieron mejores resultados utilizando el medio de Murashige y Skoog (1962) que el de Knudson.

En cuanto a micronutrientes, se considera que el manganeso, boro, zinc, cobre y molibdeno pueden o no estar presentes en los medios de cultivo para desarrollo in vitro, aunque generalmente se añaden de manera rutinaria (Hartmann, 1975). La solución de microelementos más utilizada es la de Heller (Martin, 1977) que ha sido hasta el momento la que ha dado resultados más satisfactorios. En el caso del fierro, éste es usualmente esencial y puede ser proporcionado de diferentes formas: tartrato de fierro (1 ml/ 1% solución concentrada); fierro inorgánico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg/l o  $\text{FeSO}_4$ , 2.5 mg/l) o como fierro quelatado

## CUADRO 3. ESPECIES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE PROPAGADAS in vitro.

ESPECIE	MEDIO UTILIZADO	REFERENCIA
<u>Aranda</u>	Vacin y Went	Loh et al, 1975; Teo y Teo, 1974
<u>Arundina bambusifolia</u>	Vacin y Went Knudson C Raghavan y Torrey	Mitra, 1971
<u>Ascofinetia</u>	Vacin y Went	Intuwong y Sagawa, 1973
<u>Cattleya</u>	Knudson C	Arditti, 1966 a,b,c; Champagnat y Morel, 1969; Farrar, 1963; Hirsch, 1959; Knudson, 1951; Morel, 1965
<u>Cattleya</u>	Knudson III Lindemann, Gunckel y Davidson Vacin y Went Morel	Morel, 1964 Lindemann et al, 1970
<u>Cattleya skinnerii</u>	Knudson C Vacin y Went Morel	Knudson, 1951 Skully, 1967
<u>Cymbidium</u>	Knudson C Knudson III White Knudson C Vacin y Went Knudson Tsuchiya	Champagnat et al, 1966 Morel, 1964 Steward y Mapes, 1971 Thompson, 1971 Morel, 1965; Wilfret, 1966 Wimber, 1963

ESPECIE	MEDIO UTILIZADO	REFERENCIA
<u>Dendrobium</u>	Marston	Marston, 1966
<u>Dendrobium nobili</u>	Vacin y Went	Sagawa y Valmayor, 1966; Sagawa y Valmayor, 1967
<u>Dendrobium</u> Jackelyn Thomas	Vacin y Went	Singh y Sagawa, 1972
<u>Dendrobium phalaenopsis</u>	Vacin y Went	Kim et al, 1970
<u>Dendrobium uniwai crystal</u>	Vacin y Went	Sanguthai et al, 1973
<u>Epidendrum</u>	Murashige y Skoog Knudson C	Churchill et al, 1970
<u>Epidendrum O'brienianum</u>	Heller Knudson 'M' Medium Murashige y Skoog Ojima y Fujiwara	Churchill et al, 1970,1973  Churchill et al, 1971 Rudolph et al, 1972 Churchill et al, 1972
<u>Laeliocattleya</u>	Heller	Churchill et al, 1971
<u>Portia mayflower</u>	Knudson 'M' Medium Murashige y Skoog	Churchill et al, 1970,1973
<u>Lycaste</u>	Knudson C	Morel, 1965
<u>Odontoglossum</u>	Knudson C	Morel, 1965
<u>Phalaenopsis</u>	Knudson C  Vacin y Went	Ernst, 1967 a,b; Ernst et al, 1970; Sagawa, 1961  Intuwong et al, 1972; Kotomori y Myrashige,1965 Skully, 1965,1966, Arditti Rtal, 1977.

ESPECIE	MEDIO UTILIZADO	REFERENCIA
<u>Phalaenopsis</u> sunfidor	Vacin y Went	Intuwong y Sagawa, 1974
<u>Schomburgkia</u> <u>superbiens</u>	Morel	Skully, 1967
	Vacin y Went	Teo et al, 1973
<u>Vanda</u>	Vacin y Went	Teo et al, 1973
<u>Vanda</u> Joaquim	Vacin y Went	Sagawa y Seghal, 1967
	Vacin y Went	Kunisaki et al, 1972
<u>Vanda</u> Kuniko Sugihara	Vacin y Went	Sanguthai y Sagawa, 1973

(NaFeEDTA 25 mg/l o Na<sub>2</sub>EDTA+ FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) en concentraciones equimolares para dar 0.1 mM de hierro.

En relación a minerales añadidos en cultivo in vitro de orquídeas, se menciona la adición de hierro quelatado y micronutrientes al medio de Knudson para cultivos de ápices de varias especies (Rosa et al, 1977; Stolts, 1979). Así también se mencionan los efectos de la concentración iónica total (cati6n/ani6n de la relaci6n NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de los microelementos en el desarrollo de Bletilla striata (Ichihashi, 1979) y la adici6n de carb6n activado el medio de cultivo de Cymbidium con efectos favorables (Wang et al, 1976).

### c.2. Azúcares

En general la literatura sobre micropropagaci6n de orquídeas señaala poco sobre la adici6n de azúcares al medio. Las únicas citas encontradas plantean la adici6n de 2% de sacarosa. (Hartmann, 1975; Intuwong y Sagawa, 1975; Chong Hua, 1976; Kusomoto, 1980).

### c.3. Reguladores del crecimiento

Las auxinas más utilizadas en el cultivo in vitro de especies vegetales, son el ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.1 a 10 mg/l; el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) de 0.05 a 0.5 mg/l y el ácido indolacético (AIA) de 1 a 50 mg/l (Hartmann, 1975). Según Weaver (1976), parece que la principal funci6n de las auxinas en el desarrollo de cultivos de tejidos

in vitro es estimular la división celular y fomentar el desarrollo de callos, de los que pueden desprenderse crecimientos similares a raíces.

En relación a las citocininas, su acción se traduce fundamentalmente en dos efectos: provocar la división celular y regular la diferenciación en los tejidos cultivados (Weaver, 1976).

Las citocininas interactúan con las auxinas para mostrar expresiones diferentes de crecimiento (Weaver, 1976). Skoog y Miller (1957) demostraron in vitro el modo en que cualquier cambio de equilibrio entre citocininas y auxinas pueden afectar las expresiones del crecimiento. Cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces, pero cuando la cantidad de citocininas es elevado, se desarrollan yemas adventicias. Cuando la relación es intermedia, se desarrollan tejidos de callos no diferenciados (Weaver 1976) o bien resulta la producción de tallos y raíces (Hartmann 1975).

En las orquídeas, una de las características que facilita su cultivo in vitro, es la formación del protocormo a partir de callos, el cual permite la obtención de un número teóricamente ilimitado de plántulas sin recurrir a la acción de hormonas (Vacherot, 1977)

Sin embargo existen varias referencias sobre la utilización de reguladores del crecimiento en los estudios sobre micropropagación de orquídeas.

El uso de citocininas como la 6-furfurilaminopurina (Kinetina) y la 6-benciladenina (6-BA), de auxinas como el 2,5-D, el ANA y el AIA y de giberelinas como el  $GA_3$  frecuentemente se utilizan en forma única o combinada.

Las citocininas incrementan el desarrollo de yemas foliares en - Dendrophthoe falcata puestas en cultivo in vitro (Nag y Johri 1970); la N-benciladenina, N-benciladenosina y la kinetina añadidas al medio de cultivo de Cymbidium tienen un efecto similar. A concentraciones de 0.1 pp, retrasan el desarrollo del protocormo a plántulas, sin cambios morfológicos; en concentraciones de 1 ppm la formación de raíces y pelos se inhibe y a 10 ppm la alta estimulación del protocormo va acompañada de efectos teratogénicos y tóxicos. Sin embargo todos estos efectos son reversibles al transplantar los protocormos a un medio libre de citocininas (Rucher, 1974). La kinetina a concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$ , promueve en Vanda la formación de protocormos y la iniciación de hojas y raíces, pero con menor efecto que el AIA (Chong y Hua, 1978). El 6-BA a 0.1 mg/l estimula la proliferación de protocormos en Cattleya (Kusomoto, 1979 a)

Sobre la acción de auxinas aplicada en forma única, encontramos que la adición de ANA o 2,4-D es esencial para que se inicie el desarrollo de los inóculos en Cattleya (Ichihashi et al, 1973); en el cultivo de yemas axilares de Epidendrum, en cambio se menciona que el ANA no tiene efecto sobre el crecimiento de la plántula

(Stewart et al, 1976). En Vanda se observa que el AIA ( $10^{-6}$  a  $10^{-5}$ ) estimula la formación de protocormos en cultivos de embriones (Chong y Hua, 1978).

El uso combinado de citocininas y auxinas es frecuente. En Cymbidium la adición de ANA a 0.01-1 mg/l y Linetina a 0.1-1 mg/l estimula la formación de yemas y su desarrollo, mientras que el desarrollo normal de protocormos se da con la adición de Kinetina a 0.1-1 mg/l y ANA a 0.01-0.1 mg/l (Kusomoto, 1978). En Cattleya se observa que la combinación de BA a 5 mg/l y ANA a 1 mg/l dan una proliferación máxima de protocormos; que el uso de 2,4-D sólo a concentraciones mayores de 0.5 mg/l mata a los protocormos y la adición de kinetina o 6-BA parecen disminuir el efecto tóxico (Kusomoto, 1979 a). En las plántulas de Cattleya desarrolladas in vitro, el medio de cultivo con efectos más positivos para el crecimiento de plántulas incluye 0.1-1 mg/l de kinetina y 0.1 mg/l de 2,4-D. La formación del tallo es promovida más efectivamente utilizando 6-BA a 1 mg/l y ANA a 0,5 mg/l o Kinetina 0.1 mg/l y 2,4-D a 0.1 mg/l. La Kinetina a 0.1-0.5 mg/l y 2,4-D a 0.5 mg/l o 6-BA a 0.5-5 mg/l y 2,4-D a 0.5-1 mg/l forman gran número de protocormos alrededor de los meristemas apical y axilar del tallo.

El ácido giberélico ( $GA_3$ ) se utiliza en cultivo in vitro de orquídeas generalmente en combinación con auxinas o citocininas. Así, en estudios sobre efectos de reguladores del crecimiento

in vitro de Cymbidium, se observa que el medio conteniendo  $GA_3$  a 0.1-1 mg/l y 2,4-D a 0.01 mg/l estimula la formación de protocormos a partir de yemas y, aumentando la cantidad de 2,4-D a 0.1 mg/l se forman yemas aberrantes. La presencia de  $GA_3$  a 1 mg/l y 2,4-D a 0.1 mg/l tiene efectos prominentes sobre el desarrollo del tallo, sin embargo, también se observan tallos morfológicamente anormales. La adición de  $GA_3$  a 1 mg/l da lugar a un crecimiento constante del tallo, mientras que manteniéndolo a 0.1 mg/l se da un desarrollo normal de protocormos. Utilizando  $GA_3$  a 1 mg/l y ANA a 0.1 mg/l se logra el mejor desarrollo de raíces y a concentraciones más altas se forman raíces aberrantes (Kusomoto, 1978).

En Aranda el  $GA_3$  ( $10^{-5}$ ) y al AIA ( $10^{-4}$ ) estimulan la formación de protocormos de yemas apicales (Chong y Hua, 1978).

#### c.4. Complejos orgánicos

Los complejos orgánicos más utilizados en cultivo de tejidos son la leche o agua de coco, en un porcentaje de 10 a 15 por volumen; el extracto de levadura y los complejos de aminoácidos como la caseína hidrolizada (Hartmann, 1975).

En el caso del cultivo in vitro de orquídeas, los dos tipos de complejos orgánicos más utilizados son el agua de coco y el puré o jugo de plátano.

El agua de coco se usa al 10% para el desarrollo de yemas apica

les y axilares de Cattleya (Ichihashi et al, 1975); de yemas axilares y terminales de Phalaenopsis (Intuwong y Sagawa, 1975 b) en concentraciones de 10% para cultivo de yemas axilares de Epidendrum Obrienianum (Stewart et al, 1976) y en un 10 a 25% para incrementar la rapidez de desarrollo en protocormos de Cymbidium y en un 10% para aumento de peso fresco (Kusomoto 1980). El jugo de plátano se ha usado para mejor desarrollo de plántulas de Cymbidium (Kusomoto, 1978); combinando con agua de coco para cultivo de ápices vegetativos de Cymbidium (Rosa et al, 1977) para producir proliferación prominente de protocormos de Cattleya aunque sus efectos sobre la formación del tallo son menores que los efectos de los reguladores del crecimiento (Kusomoto, 1979 a). Se mencionan otros suplementos orgánicos como el extracto de levadura que acelera la propagación de protocormos y retarda la organogénesis (Kusomoto, 1978); el extracto de levadura combinado con peptona, urea y ANA para incrementar el desarrollo y diferenciación de protocormos de Vanda (Mathews, 1980) y el trypton para organogénesis de Cymbidium (Kusomoto, 1978).

#### d) Factores físicos

Se consideran como factores físicos la temperatura, intensidad luminosa y fotoperíodo, pH y el estado físico de medio.

En relación a la acción de estos factores en el cultivo de tejidos de orquídeas existe poca información. El cultivo de meris

temos de Cattleya se utiliza una temperatura de 25°C (Ichihashi 1973) y de 24°C en la germinación in vitro de semillas de Paphipedilum (Ernst e Irving, 1974). Para la intensidad lumínica se utiliza una iluminación de 2000 lux para cultivos de meristemos a base de lámparas fluorescentes (Ichihashi, 1973) y para la germinación de semillas de Paphipedilum (Ernst e Irving 1974). En cuanto al estado del medio cultivo, la consistencia sólida o líquida parece tener un efecto directo sobre el tipo de desarrollo. El cultivo de meristemos de Cattleya se ha hecho en medio líquido a una rotación de 0.86 rpm y a una agitación de 90 rpm para mejor desarrollo (Ichihashi et al, 1973).

En cambio para cultivo de meristemos de Phalaenopsis se ha utilizado el medio solidificado con 0.9% de agar (Intuwong y Saga wa, 1975 b). Hartmann (1975) señala que el cultivo de meristemos apicales de orquídeas puede realizarse en un medio solidificado con agar, con soporte de papel filtro o en medios líquidos con agitación a rotación constante. Que bajo estas condiciones últimas se forman nuevas protuberancias laterales que pueden ser cultivadas cada tres o cuatro semanas tras haber sido seccionadas, y que la producción de protocormos nuevos continuará mientras continúe el movimiento, de rotación. Cuando se desee que se formen plantas, se transfieren los protocormos a un medio con agar y se deja que las plantas se desarrollen sin transplantar a otro medio. Aproximadamente en ocho meses se desarrollan raíces y hojas y las nuevas plantas se

transplantan a suelo. Así también se menciona que los efectos de reguladores del crecimiento son diferentes en medio líquido que en sólido (Kusomoto, 1980).

e) Contaminación en cultivos in vitro

Existe poca bibliografía al respecto de microorganismos contaminantes en cultivo in vitro de tejidos vegetales y métodos de desinfectación. Esto a pesar de ser uno de los problemas más frecuentes que se presentan en esta técnica.

Según Coriell las vías de contaminación de células cultivadas in vitro pueden agruparse en cuatro aspectos; inóculos contaminados; material de cristalería o equipo; medio de cultivo y contaminación por corrientes de aire. La frecuencia de ocurrencia de cada fuente de contaminación varía entre laboratorios y cambia en cada laboratorio con los cambios de estación, clima, personal, procedimientos, limpieza, fuentes de abastecimiento, etc. La desinfectación de los inóculos es uno de los aspectos más difíciles de controlar. Según Coriell, la ausencia de contaminantes microbianos en los inóculos no puede asegurarse, pero debe ser probada por medio de pruebas de esterilización en cultivo de células antes de aceptarse como limpias.

Uno de los más grandes avances en prevención de contaminación por flujos de aire, es el uso de "aire laminar filtrado" por medio de filtros de alta eficiencia (filtros HEPA). El efecto se traduce en un ambiente libre de gérmenes, sustituyendo el aire contaminado por aire filtrado libre de microorganismos, quedando áreas adecuadas para el trabajo (Coriell, 1979).

La incorporación de penicilina y otros antibióticos en el medio de cultivo y el uso de propagar o replicar cultivos para estudios cuantitativos, abrieron las puertas para el cultivo masivo (Coriell, 1979). Sin embargo, hay objeciones al uso generalizado de antibióticos para control de contaminantes; los antibióticos no destruyen a todos los microorganismos, algunos sólo son suprimidos o retardado su metabolismo; se descuidan las técnicas asépticas por el uso de antibióticos; se forma resistencia a antibióticos en muchos microorganismos, siendo después más difícil controlarlos; la penicilina causa conversión de algunas bacterias a formas L, las cuales crecen rápidamente pero no son fácilmente detectadas; por el efecto de antibióticos se pierden índices obvios de contaminación como cambios de pH, turbiedad, evidencias microscópicas. Es por tanto que los antibióticos no deben ser utilizados rutinariamente, tratando de sustituirlos por técnicas asépticas. Existen, sin embargo, usos legítimos de los antibióticos, por ejemplo, preparación de cultivo de células de especímenes contaminados. El principio es utilizar altas concentraciones de antibióticos bactericidas por corto tiempo y después desecharlos (Coriell, 1979).

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Material vegetativo

Para el presente trabajo se utilizaron plantas de vainilla (Vanilla planifolia A.) obtenidas del invernadero del Programa de Floricultura de la Comisión Nacional de Fruticultura y de un vivero particular, localizado en el municipio de Papantla, Veracruz.

Antes de tomar los inóculos de las plantas, unas fueron colocadas en un invernadero y otras en un cuarto estufa con temperatura de 27°C y humedad relativa del 40%

#### 3.2 Medios de cultivo

##### 3.2.1 Sales minerales

Los medios básicos nutritivos utilizados estaban constituidos por:

- a) Sales de Knudson (1946) + 3% de sacarosa
- b) Sales de Murashige y Skoog (1962) + 3% de sacarosa, 170 mg/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l de *D*-inositol y 0.4 mg/l de tiamina - HCl. El estado físico del medio fue el sólido, para lo cual se utilizó agar al 0.8% (Difco-BActo agar). El pH se ajustó a 5.7  $\pm$  0.1 utilizando soluciones 1N de NaOH y HCl. Se utilizaron 25 ml de medio por tubo, los tubos se taparon con tapones de polipropileno. La esterilización del medio se realizó en autoclave 15 minutos a 120°C y 1 Kg/cm<sup>3</sup>.

### 3.2.2 Reguladores del crecimiento

Se utilizaron como reguladores del crecimiento para probar su efecto sobre el desarrollo del inóculo, las citocininas 6-furfurilaminopurina (kinetina), 6-benciladenina (6-BA) y 6,y,y-dimetilalilaminopurina (2, isopenteniladenina o 2,iP). y las auxinas ácido a-naftalenacético (ANA), ácido b-indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB)

Las concentraciones a probar tanto para citocininas y auxinas fueron 0,1,3,10 y 30 mg/l con repeticiones de 10 a 20 tubos por concentración. (La Kinetina se probó en concentración de 0,0.3, 1,3 y 10 mg/l). la Kinetina, 6-BA y 2,iP se probaron en relación a su acción para romper latencia de yemas axilares y apicales y obtener su desarrollo a plantas. El ANA, AIA y AIB se evaluaron en relación a su acción para formación de callos.

### 3.3. Preparación, desinfestación y siembra del material vegetativo.

Como inóculos para cultivo in vitro se utilizaron yemas axilares yemas apicales y secciones de tallo. Para preparar los inóculos de las plantas de vainilla, se cortaron segmentos de tallo con el número de yemas a sembrar, se eliminaron las hojas y se enjuagaron con agua corriente. Para las yemas axilares se tomaron secciones nodales de tallo 3 cm de longitud, conteniendo cada una una yema. Las yemas apicales se cortaron con 0.5 cm de tallo y las secciones de tallo se tomaron de la

zona interdental con 1 cm de largo. En todos los pasos se procuró realizar el corte sumergiendo la sección de la planta en una solución antioxidante conteniendo 100 mg/l de ácido ascórbico y 150 mg/l de ácido cítrico. Posteriormente se lavaron los cortes con agua y detergente y se enjuagaron con agua destilada conteniendo los antioxidantes.

La desinfección se realizó envolviendo los inóculos en tela de gasa y sumergiéndolos durante tres minutos en alcohol etílico al 70% y luego en el desinfectante a probar.

Los desinfectantes probados fueron

- a) Hipoclorito de sodio al 0.6 y al 1.2% durante 15 minutos y al 4% durante 15 y 30 minutos. Se usó la preparación comercial de Cloralex, con 6% de ingrediente activo como fuente de hipoclorito de sodio.
- b) Hipoclorito de calcio al 0.5% y 2% durante 15 minutos; al 4% durante 15, 30 y 45 minutos y al 10% durante 5, 10 y 15 minutos
- c) Fosfato trisódico al 10% durante 10 minutos
- d) Fosfato trisódico al 10% durante 10 minutos seguido de hipoclorito de calcio al 2% durante 15 minutos
- e) Bicloruro de mercurio al 0.01% durante 5 minutos y, al 0.1% durante 5, 10 y 15 minutos.

f) Bicloruro de mercurio al 0.01 y al 0.02% durante 5 minutos seguido de hipoclorito de calcio al 2% durante 15 minutos.

g) Bicloruro de mercurio al 0.1% durante 5, 10 y 15 minutos seguido de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos

A todas las soluciones de desinfestación se les agregó unas gotas de detergente como agente humectante y durante la desinfestación se utilizó una bomba de vacío (AEI AC Motor PH 1Volts 100/125).

Tras la desinfestación se enjuagaron los cortes con agua esterilizada tres veces.

Para preparar los inóculos a sembrar, en el caso de las yemas axilares, se cortaron, unas junto con tallo( 2 cm por debajo y 0.5 cm por arriba de la yemas) y otras se aislaron, conteniendo sólo 2 mm del tejido adyacente del tallo (yemas aisladas) Los ápices de tallo se cortaron a 0.5 cm de largo. A las secciones del tallo, cortadas en forma de discos con un grosor de 3 a 5 mm se les quitó la corteza con un bisturí, haciendo cortes de tal manera que quedara un inóculo de forma triangular y dejando los tejidos parenquimatoso y meristemático del tallo.

El proceso de aislamiento y corte de órganos y tejidos se realizó con ayuda del microscopio e instrumental de disección, bajo condiciones de asepsia. Para ésto se utilizó una campana de aire laminar filtrado marca Veco Mod. GMFL-A12 con filtros HEPA.

Las cajas de petri donde se realizaron los cortes se esterilizaron en autoclave. Las pinzas y bisturíes usados se sumergieron en alcohol y se flamearon antes y después del corte y siempre de cada inóculo.

Se colocó un inóculo por tubo de cultivo y se sembraron de 10 a 20 muestras por tratamiento.

#### 3.4 Condiciones ambientales de incubación

Las condiciones en que se colocaron los cultivos fueron: en condiciones de laboratorio y en cámaras de ambiente controlado a temperatura de 27°C, 16 horas luz y 2000 lux de intensidad lumínica.

#### 3.5 Observaciones y toma de datos

Se tomaron datos cada semana sobre los siguientes aspectos:

- a) Porcentaje y tipo de contaminación
- b) Porcentaje de oxidación
- c) En cultivo de yemas axilares y apicales:
  - c.1. Longitud de brote
  - c.2. Número de yemas axilares desarrolladas in vitro
  - c.3. Número y longitud de raíces
- d) En cultivo de secciones de tallo
  - d.1. Formación de callos
  - d.2. Formación de plántulas

El diseño experimental se realizó por bloques al azar.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Material vegetativo

De los tres tipos de inóculos utilizados, ápices de tallo, yemas axilares y secciones de tejidos del tallo, sólo las yemas axilares mostraron desarrollo en condiciones in vitro. Los ápices de tallo no presentaron crecimiento y un 90% de ellos se oxidaron o volvieron cloróticos. Las secciones de tallo sembradas no formaron callosidades.

En relación al tamaño de las yemas axilares, en el medio de Murashige y Skoog conteniendo 1 mg/l de 6-BA, utilizando yema axilar con tallo y yema axilar aislada, se obtuvieron desarrollo máximos del brote de 52 y 30 mm respectivamente (cuadros 3 y 5). En medio de Knudson conteniendo 1 mg/l de 6-BA, los crecimientos máximos de los brotes a partir de yema axilar con tallo y yema axilar aislada, fueron 64 y 16 mm respectivamente. La posición del inóculo en la planta también es determinante en su desarrollo in vitro. Las yemas axilares cercanas al ápice crecieron más lentamente y alcanzaron menor desarrollo que las yemas axilares de las regiones basal y media de la planta.

### 4.2 Contaminación y desinfestación del material vegetativo

#### 4.2.1. Agentes contaminantes

##### 4.2.1.1 Hongos

La contaminación por hongos llegó a ser hasta de un 90-95% en varios experimentos. Por lo general una especie de hongo fue la más comunmente encontrada. En la mayoría de los casos, los

hongos desarrollados primero sobre el inóculo y después en el medio cultivo. Esto indicó que la fuente de contaminación más probable era el inóculo y por tanto la desinfestación no fue la adecuada.

Con el fin de lograr una desinfestación eficaz se procedió a identificar las especies de hongos más frecuentes en los cultivos. La identificación de éstas se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Industrias de la Universidad Autónoma Chapingo.

Se procedió primero a aislar las diferentes cepas y se realizaron microcultivos en placas de agar nutritivo y de Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Se observaron al microscopio los microcultivos y se compararon con observaciones de preparaciones elaboradas con material obtenido directamente de los inóculos desinfestados

La identificación de las especies se hizo por caracterización de las colonias (tipo de crecimiento, textura, color) y cuerpos fructíferos. Las especies identificadas fueron: Rhizopus spp, Fusarium spp, Bispora spp, Alternaria spp, Bipolaris sp, Stignella sp y Monilia sp.

#### 4.2.1.2 Bacterias

La contaminación por bacterias fue de 80 a 100% en las siembras in vitro. Se observó una cepa en especial, presente en todas los cultivos contaminados. Esta cepa se caracterizó por presentarse en forma de "velos" blancos alrededor de la parte del

inóculo que queda introducida en el medio de cultivo. El tiempo que tardó en aparecer varió de una a cuatro semanas. En los cultivos con más de ocho semanas de incubación comenzó a desprender gas y a romper el medio gelificado. Para la identificación de bacterias se tomaron muestras de diferentes tubos contaminados se aislaron las diferentes cepas mediante siembras sucesivas en cajas de petri con agar nutritivo. La caracterización de las diferentes cepas se realizó con base en la colonia (textura, color tipo de crecimiento) y en la observación al microscopio de preparaciones con tinción de gram. La cepa más frecuentemente presentada se caracterizó por ser gram negativa; dispuesta en cadenas largas y uniformes; bacilo largo, recto y con extremos redondeados; esporulados; crecimiento anaerobio facultativo presentándose como "Velos blancos" en el estado anaerobio y como una "nata blanca lechosa" en las colonias aerobias.

Estas características indican la posibilidad de que sean los géneros Erwinia o Bacillus.

Así también en las pruebas realizadas para identificar la presencia de bacterias en los tejidos del tallo y hojas de vainilla, se encontró Erwinia. Estas pruebas fueron realizadas en el laboratorio de Fitopatología de Sanidad Vegetal.

Prueba de antibiograma mostraron sensibilidad de la bacteria a los antibióticos gentamicina (10 microgramos), kanamicina (30 microgramos), eritromicina (15 microgramos) cloranfenicol (30 microgramos), rifomicina (15 microgramos) y tetraciclina (10 microgramos).

4.2.2 Efecto del pretratamiento en la planta madre sobre la contaminación in vitro.

El mantener a las plantas madre bajo condiciones ambientales controladas de alta temperatura (27°C) y baja humedad relativa (40%) para buscar disminuir la contaminación in vitro, no tuvo efecto (cuadro 1). Tampoco se disminuyó la contaminación in vitro al lavar las plantas madre con hipoclorito de sodio al 1.2 y 4% tres veces por semana durante tres semanas antes de cortar y sembrar los inóculos.

4.2.3 Efecto del tipo y tamaño del inóculo en la contaminación  
el tamaño y origen del inóculo influyó en la contaminación presentada. De 80 a 100% de contaminación fúngica y bacteriana se presentó al sembrar yemas axilares con tallo. Al utilizar yemas axilares aisladas la incidencia de contaminación disminuyó en un 5 a 10%. En las secciones de tallo la contaminación fue de 30 a 60% y en los ápices de tallo, con 0.5 cm de longitud, no se presentó contaminación alguna (cuadro 1).

#### 4.2.4 Efecto de los desinfectantes

Los resultados sobre desinfección que se presentan fueron obtenidos en el cultivo de yemas axilares con tallo. Esto debido a que es el inóculo que mostró mejor desarrollo y mayor índice de contaminación

##### 4.2.4.1 Fosfato trisódico.

El fosfato trisódico en solución al 10% y en periodos de 10, 15 y 30 minutos no fue efectivo para disminuir la contaminación

por hongos y bacterias. La contaminación bacteriana fue de 100% y la fúngica de 85-100% (cuadro 1).

#### 4.2.4.2 Hipoclorito de calcio

El hipoclorito de calcio usado al 2% durante 15 minutos disminuyó la contaminación por hongos de un 100% a un 74% pero la contaminación bacteriana continuó en 100%. Al reducir la concentración y tiempo de exposición al desinfectante aumentó la contaminación por hongos. El dar más tiempo de desinfección no disminuyó la contaminación, pero si aumentó el porcentaje de oxidación de las yemas. A concentraciones de 4 y 10% se redujo la contaminación por bacterias y hongos, pero la oxidación de las yemas fue total (cuadro 1).

#### 4.2.4.3 Hipoclorito de sodio

Utilizando el hipoclorito de sodio al 1.2% por 15 minutos, se presentó una contaminación del 88% del bacilo blanco y 58% de hongos. Al disminuir dicha concentración y tiempo, se presentó un 100% de contaminación. Al usar el desinfectante al 4% se presentó un 100% de contaminación. Al usar el desinfectante al 4% se redujo la presencia de microorganismos, pero se oxidaron las yemas hasta en un 80% (cuadro 1).

#### 4.2.4.4 Bicloruro de mercurio

El bicloruro de mercurio en solución al 0.1% y por periodos de 10 y 15 minutos, controló hasta en un 100% la presencia de hongos y disminuyó la contaminación causada por el bacilo blanco

de 100 a 75%. A esta concentración se observaron resultados muy variables en cuanto a índice de oxidación en los cultivos in vitro y además cierta disminución en el crecimiento y vigor de los brotes. Concentraciones menores del desinfectante mostraron ser efectivas para controlar la presencia de hongo, pero no la de bacterias. El aumento de tiempo de desinfección no mostró mayor control de contaminantes y si un aumento en la oxidación y disminución del crecimiento (cuadro 1).

#### 4.2.4.5 Fosfato trisódico e hipoclorito de calcio

Al usar fosfato trisódico al 10% durante 10 minutos seguido por hipoclorito de calcio al 2% durante 5, 10 y 15 minutos, se presentó una contaminación bacteriana del 100% y fúngica del 60% (cuadro 1).

#### 4.2.4.6 Bicloruro de mercurio e hipoclorito de calcio

Utilizando bicloruro de mercurio en una concentración de 0.01% durante 10 minutos seguidos por el hipoclorito de calcio al 2% durante 15 minutos, se disminuyó la contaminación fúngica de un 100% a un 6.6% y la bacteriana a 75% (cuadro 1).

#### 4.2.4.7 Bicloruro de mercurio e hipoclorito de sodio

El bicloruro de mercurio a una concentración de 0.1% en periodos de 5, 10 y 15 minutos seguido por el hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos, disminuyó la contaminación por hongos de un 100% a un 20% y la de bacterias a 45% (cuadro 1).

4.2.5 Efecto de la sacarosa como fuente de carbono para los microorganismos contaminantes.

Al disminuir la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de 3% a 1 y 0% se observó una disminución en la contaminación bacteriana de 100 a 40% y en la fúngica a 0%. Sin embargo se observó también una disminución considerable en el ritmo de crecimiento y vigor de las yemas. (Los inóculos se desinfectaron con bicloruro de mercurio al 0,1% durante 10 minutos (cuadr 2).

#### 4.3 Medios de cultivo

##### 4.3.1 Sales inorgánicas

Las yemas axilares, secciones de tallo y ápices de tallo incubadas en medios de cultivo conteniendo las sales de Knudson o las de Murashige y Skoog, no mostraron diferencias en su desarrollo las yemas axilares sembradas en el medio de Knudson o en el medio de Murashige y Skoog con 1 mg/l de 6-BA, desarrollaron brotes de 64 y 52 mm respectivamente, después de siete semanas de incubación.

##### 4.3.2 Reguladores del crecimiento

En el medio de Murashige y Skoog con 1 mg/l de 6-BA se obtuvo un crecimiento máximo del brote de 52 mm con la formación de tres nuevas yemas axilares (cuadro 3). En el medio de Knudson conteniendo 1 mg/l de 6-BA el desarrollo máximo fue de 64 mm con una formación de tres nuevas yemas axilares (cuadro 4). Utilizando el 6-BA a mayores concentraciones, 3,10 y 30 mg/l el

crecimiento del brote disminuyó. Además en las concentraciones de 10 y 30 mg/l se observó la formación de yemas semejantes a las de las inflorescencias y en la base del brote formaron estructuras semejantes a callosidades (cuadro 3,4,5 y 6).

Utilizando la kinetina en una concentración de 1 mg/l en el medio de Knudson, se observó un crecimiento máximo del brote de 60 mm con formación de cinco nuevas yemas axilares (cuadro 7). Con las concentraciones de 0. y 0.3 mg/l de kinetina se obtuvieron desarrollados del brote de 58 mm con formación de cuatro nuevas yemas axilares. En presencia de 3 y 10 mg/l de kinetina el desarrollo máximo del brote fue de 50 y 51 mm con cuatro nuevas yemas formadas, respectivamente (cuadro 7). En el medio Murashige y Skoog conteniendo kinetina, los brotes alcanzaron una longitud máxima de 7 mm (cuadro 8).

En el medio de Murashige y Skoog el 2. iP en una concentración de 1 mg/l dió lugar a un crecimiento máximo del brote de 46 mm con una formación de tres nuevas yemas axilares. En concentraciones de 3,10 y 30 mg/l el crecimiento disminuyó a 37, 25 y 19mm respectivamente (cuadro 9). En el medio nutritivo de Knudson conteniendo 2, iP, el desarrollo de los brotes fue menor que en medio de Murashige y Skoog, lográndose un crecimiento máximo de 15 mm en presencia de 1 mg/l de 2, iP (cuadro 10).

El mayor número de raíces adventicias formadas in vitro se obtuvo en el medio nutritivo de Knudson conteniendo kinetina a 0,0.3 y 1 mg/l, formándose hasta cuatro raíces adventicias por plántula con longitudes máximas de 15, 33 y 17 mm respectivamente. A

concentraciones de 3 y 10 mg/l de kinetina el número de raíces formadas in vitro fue de 1 con longitud máxima de 5mm (cuadro 7). En el medio de Murashige y Skoog conteniendo 6-BA kinetina o 2, iP el número máximo de raíces adventicias formadas por brote fue de 1, en todas las concentraciones utilizadas (cuadro 3,4,5 6,9 y 10).

Las auxinas AIA, AIB y 2,4-D agregadas al medio de cultivo en concentraciones de 0 a 10 mg/l no fueron efectivas para inducir la formación de callosidades en las secciones internodales del tallo incubadas durante ocho semanas de incubación, los inóculos comenzaron a volverse cloróticos y en la octava semana aproximadamente el 90% estaban totalmente incoloros.

#### 4.4. Condiciones de incubación

Los brotes desarrollados en cámaras de ambiente controlado (27°C, 16 horas luz 2000 lux de intensidad lumínica) mostraron mayor vigor y mejor aspecto que los desarrollados en condiciones ambientales de laboratorio. Sin embargo no se observaron diferencias en las longitudes alcanzadas por los brotes a las siete semanas de incubación.

#### 4.5 Transplante de propágulos

De las yemas axilares seccionadas y transplantadas a un medio nutritivo fresco, sólo el 36% desarrollaron en nuevos brotes, con un crecimiento máximo de 5 mm en longitud, a los 44 días de incubación. En un 22% de los brotes desarrollados se formaron

raíces adventicias con una longitud máxima de 7mm. Las yemas  
transplantadas que no desarrollaron se deshidrataron y secaron.

Planta de vainilla  
(V. planifolia A) desarrollada  
sobre árbol tutor  
(Erythrina americana).



Brotos de vainilla  
desarrolladas in vitro, con  
formación de yemas axilares  
y raíces adventicias.

Brotos de vainilla desarrollados  
in vitro, contaminados por  
Erwinia



Microfotografía del bacilo  
Erwinia, encontrado en cultivos  
in vitro de vainilla (Se utilizó  
tincióngram, 100 X ).

CUADRO 1. METODOS DE DESINFESTACION APLICADOS A INOCULOS DE VAINILLA Y SU EFECTO SOBRE LA CONTAMINACION in vitro.  
 LOS MEDIOS NUTRITIVOS UTILIZADOS CONTENIAN LAS SALES INORGANICAS DE MURASHIGE Y SKOOG (1962), 3% SACAROSA,  
 170 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l INOSITOL, 0.4 mg/l TIAMINA·HCl Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR O LAS DE KNUDSON (1946)  
 3% SACAROSA Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR, COMPLEMENTADOS CON KINETINA, 6-BA O 2, iP. DATOS TOMADOS A LAS 7 SEMANAS  
 DE INCUBACION.

TRATA- MIENTO	DESINFES- TANTE	CNC. (% de I.A.)	t	No. (min)	INOCULO	PRET.	R E S U L T A D O S														
							CULTIVOS ASEPTICOS					CULTIVOS CONTAMINADOS									
							BACTERIAS			HONGOS		BACTERIAS Y HONGOS			TOTAL						
							No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC			
1	$\text{HClO}_3\text{Na}$	0.6	15	50	Y+T	Inv.	7	14	(6-27)	6	12	(5-24)	0	0	(0-7)	37	74	(57-84)	43	86	(73-94)
2	$\text{HClO}_3\text{Na}$	0.6	15	50	Y+T	Inv.	0	0	(0-7)	15	30	(18-44)	0	0	(0-7)	35	70	(56-82)	50	100	(93-100)
3	$\text{HClO}_3\text{Na}$	0.6	15	50	Y+T	Inv.	0	0	(0-7)	34	68	(54-80)	0	0	(0-7)	16	32	(20-46)	50	100	(93-100)
4	$\text{HClO}_3\text{Na}$	0.6	20	50	Y+T	Inv.	0	0	(0-7)	36	72	(57-84)	0	0	(0-7)	14	28	(16-43)	50	100	(93-100)
5	$\text{HClO}_3\text{Na}$	1.2	15	50	Y+T	Inv.	6	12	(5-24)	15	30	(18-44)	0	0	(0-7)	29	58	(43-72)	44	88	(76-95)
6	$\text{HClO}_3\text{Na}$	1.2	15	50	Y+T	Inv.	4	8	(2-19)	0	0	(0-7)	0	0	(0-7)	46	92	(81-98)	46	92	(81-98)
7	$\text{HClO}_3\text{Na}$	4	10	50	Y+T	C.E.	13	26	(15-41)	38	76	(62-87)	0	0	(0-7)	0	0	(0-7)	37	74	(59-85)
8	$(\text{HClO}_3)_2\text{Ca}$	2	15	100	Y.A.	C.E.	0	0	(0-4)	90	90	(82-95)	0	0	(0-4)	10	10	(5-18)	100	100	(96-100)
9	$(\text{HClO}_3)_2\text{Ca}$	2	15	100	Y.A.	Inv.	9	9	(4-16)	71	71	(61-80)	0	0	(0-4)	20	20	(13-29)	91	91	(84-96)
10	$(\text{HClO}_3)_2\text{Ca}$	2	15	100	Y.A.	Inv.	3	3	(1-8)	62	62	(52-72)	0	0	(0-4)	35	35	(26-45)	97	97	(92-99)

CUADRO 1.

TRATA- MIENTO	DESINFES- TANTE	CONC. (% de I.A.)	t	No. (min)	INOCULO	PRET.	R E S U L T A D O S											
							CULTIVOS ASEPTICOS						CULTIVOS CONTAMINADOS					
							BACTERIAS				HONGOS		BACTERIAS Y HONGOS		TOTAL			
							No. %	IC	No. %	IC	No. %	IC	No. %	IC	No. %	IC		
11.	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	2	15	100	Y.A.	Inv.	19	19 (12-26)	59	59 (49-69)	0	0 (0-4)	22	22 (14-31)	81	81 (72-88)		
12	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	4	15	20	Y+T	Inc.	3	15 (4-36)	17	85 (64-96)	0	0 (0-15)	0	0 (0-15)	17	85 (64-96)		
13	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	4	15	4	A	Inv-	4	100										
14	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	4	30	50	Y+T	Inv.	13	26 (15-41)	14	28 (16-43)	0	0 (0-7)	23	46 (32-61)	37	74 (59-85)		
15	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	10	15	15	Y+T	Inv.	14	93 (69-100)	1	7 (0-31)	0	0 (0-20)	0	0 (0-20)	1	7 (0-31)		
16	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	10	15	10	A	Inv.	10	100 (73-100)	0	0 (0-27)	0	0 (0-27)	0	0 (0-27)	0	0 (0-27)		
17	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	10	50	Y+T	Inv.	0	0 (0-7)	8	16 (7-29)	0	0 (0-27)	42	84 (71-93)	50	100 (93-100)		
18	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	10	50	Y+T	Inv.	0	0 (0-7)	6	12 (5-24)	0	0 (0-7)	44	88 (76-95)	50	100 (93-100)		
19	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	10															
	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	2	10	50	Y+T	Inv.	0	0 (0-7)	46	92 (81-98)	0	0 (0-7)	4	8 (2-19)	50	100 (93-100)		
20	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	10															
	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Na	2	10	50	Y+T	Inv.	0	0 (0-7)	40	80 (66-90)	0	0 (0-7)	10	20 (10-34)	50	100 (93-100)		
21	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	10															
	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	2	15	50	Y+T	Inv.	0	0 (0-7)	34	68 (54-80)	0	0 (0-7)	16	32 (18-44)	50	100 (93-100)		

CUADRO 1.

TRATA- MIENTO	DESINFES- TANTE	CNC. (% de I.A.)	t (min)	No. INOCULO	PRET.	R E S U L T A D O S															
						CULTIVOS ASEPTICOS						CULTIVOS CONTAMINADOS									
						BACTERIAS			HONGOS			BACTERIAS Y HONGOS			TOTAL						
						No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC				
22	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	10	100	Y+T	C.E.	0	0	(0-4)	40	40	(30-50)	0	0	(0-4)	60	60	(50-70)	100	100	(96-100)
	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	2	10																		
23	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	10	100	Y+T	C.E.	4	4	(1-10)	78	78	(69-86)	0	0	(0-4)	18	18	(11-27)	96	96	(90-100)
	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	2	15																		
24	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	10	15	100	Y+T	C.E.	0	0	(0-4)	80	80	(71-87)	0	0	(0-4)	20	20	(13-29)	100	100	(96-100)
	(HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	2	15																		
25	Cl <sub>2</sub> Hg	0.01	5	20	Y+T	C.E.	0	0	(0-15)	20	100	(85-100)	0	0	(0-15)	0	0	(0-15)	20	100	(85-100)
26	Cl <sub>2</sub> Hg	0.01	15	100	Y.A.	Inv.	26	26	(18-36)	42	42	(32-52)	0	0	(0-4)	32	32	(23-42)	74	74	(64-82)
27	Cl <sub>2</sub> Hg	0.1	5	20	Y+T	Inv.	0	0	(0-15)	19	95	(77-100)	0	0	(0-15)	1	5	(0-23)	20	100	(85-100)
28	Cl <sub>2</sub> Hg	0.1	10	20	Y+T	Inv.	5	25	(10-47)	15	75	(53-90)	0	0	(0-15)	0	0	(0-15)	15	75	(53-90)
29	Cl <sub>2</sub> Hg	0.1	15	20	Y+T	Inv.	3	15	(4-36)	16	80	(58-93)	0	0	(0-15)	1	5	(0-23)	17	85	(64-93)
30	Cl <sub>2</sub> Hg *	0.1	15	100	Y+T	Inv.	74	74	(64-82)	24	24	(16-33)	0	0	(0-4)	2	2	(0-7)	26	26	(18-36)
31	Cl <sub>2</sub> Hg	0.1	15	100	Y+T	Inv.	18	18	(11-27)	64	64	(54-73)	0	0	(0-4)	18	18	(11-27)	82	82	(73-89)
32	Cl <sub>2</sub> Hg	0.1	15	100	S.T.	Inv.	64	64	(54-73)	36	36	(27-46)	0	0	(0-4)	0	0	(0-4)	36	36	(27-46)

\*Datos tomados a las 3 semanas

CUADRO 1.

TRATA- MIENTO	DESINFES- TANTE	CONC. (% de I.A.)	t	No.	INOCULO	PRET.	R E S U L T A D O S														
							CULTIVOS ASEPTICOS						CULTIVOS CONTAMINADOS								
							BACTERIAS			HONGOS			BACTERIAS Y HONGOS			TOTAL					
							No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC			
33	Cl <sub>2</sub> Hg (HClO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	0.01 2	10 10	100	Y+T	Irv.	26	26	(18-36)	40	40	(30-50)	0	0	(0-4)	34	34	(25-44)	74	74	(64-82)
34	Cl <sub>2</sub> Hg HClO <sub>3</sub> Na	0.1 2	5 15	20	Y+T	Irv.	7	35	(14-59)	9	45	(22-71)	0	0	(0-15)	4	20	(7-42)	13	65	(14-54)
35	Cl <sub>2</sub> Hg HClO <sub>3</sub> Na	0.1 2	10 15	20	Y+T	Irv.	11	55	(29-78)	4	20	(7-42)	0	0	(0-15)	5	25	(10-47)	9	45	(22-71)
36	Cl <sub>2</sub> Hg HClO <sub>3</sub> Na	0.1 2	15 15	20	Y+T	Irv.	8	40	(20-45)	7	35	(14-59)	0	0	(0-15)	5	25	(10-47)	12	60	(35-80)
37	Cl <sub>2</sub> Hg HClO <sub>3</sub> Na	0.1 2	15 15	100	S.T.	Irv.	40	40	(30-50)	60	60	(50-70)	0	0	(0-4)	0	0	(0-4)	60	60	(50-70)

I.A. = Ingrediente activo

t = tiempo

PRET. = Pretratamiento

No. = Número de muestras

Irv. = Invernadero

C.E. = Cuarto estufa

Y+T = Yema con tallo

Y.A. = Yema aislada

S.C. = Sección de tejidos de tallo

IC = Intervalo de confianza de acuerdo a tablas  
de distribución binomial al 95%

CUADRO 2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA CONTAMINACION in vitro. SE UTILIZO COMO INOCULO YEMA AXILAR CON 3 CM DE TALLO. LA DESINFESTACION SE REALIZO CON CLORURO DE MERCURIO AL 0.1% DURANTE 15 MINUTOS. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALES INORGANICAS DE MURASHIGE Y SKOOG, 3% SACAROSA, 170 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l INOSITOL, 0.4 mg/l TIAMINA.HCL Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. DATOS TOMADOS A LAS 6 SEMANAS DE INCUBACION.

% CONC. SACAROSA	No. DE MUESTRAS	CULTIVOS ASEPTICOS			CULTIVOS CONTAMINADOS			HONGOS Y BACTERIAS			TOTAL					
		No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC	No.	%	IC			
0	15	9	60	(33-81)	6	40	(19-67)	0	0	(0-20)	0	0	(0-20)	6	40	(19-67)
1	15	9	60	(33-81)	6	40	(19-67)	0	0	(0-20)	0	0	(0-20)	6	40	(19-67)
3	15	4	27	(9-56)	11	73	(44-91)	0	0	(0-20)	0	0	(0-20)	11	73	(44-91)
10	15	3	20	(5-45)	12	80	(55-95)	0	0	(0-20)	0	0	(0-20)	12	80	(55-95)

IC = Intervalo de confianza de acuerdo a tablas de distribución binomial al 95%.

CUADRO 3. EFECTO DE 6-BENCILADENINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALÉS INORGANICAS DE MURASHIGE Y SKOOG, 3% SACAROSA, 170 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l INOSITOL, 0.4 mg/l TIAMINA·HCl Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

6-BA mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	21	1	1	15
1	52	4	1	4
3	49	3	1	10
10	30	2	1	0
30	27	1	1	4

CUADRO 4. EFECTO DE 6-BENCILADENINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALÉS INORGANICAS DE KNUDSON, 3% SACAROSA Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

6-BA mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	46	3	1	16
1	64	3	1	7
3	27	2	0	0
10	32	2	0	0
30	17	1	0	0

CUADRO 5. EFECTO DE 6-BENCILADENINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES AISLADAS DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALES INORGANICAS DE MURASHIGE Y SKOOG, 3% SACAROSA, 170 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l INOSITOL, 0.4 mg/l TIAMINA Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

6-BA mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	8	0	0	0
1	30	3	0	0
3	18	1	0	0
10	8	0	0	0
30	3	0	0	0

CUADRO 6. EFECTO DE 6-BENCILADENINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES AISLADAS DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALES INORGANICAS DE KNUDSON, 3% SACAROSA Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

6-BA mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	4	0	0	0
1	16	1	0	0
3	17	1	0	0
10	9	1	0	0
30	6	0	0	0

CUADRO 7. EFECTO DE LA KINETINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALES INORGANICAS DE KNUDSON, 3% SACAROSA Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

Kinetina mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	58	4	3	15
0.3	58	4	4	33
1	60	5	3	17
3	50	5	1	4
10	51	4	1	5

CUADRO 8. EFECTO DE LA KINETINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALES INORGANICAS DE MURASHIGE Y SKOOG, 3% SACAROSA, 170 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l INOSITOL, 0.4 mg/l TIAMINA-HCl Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

Kinetina mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	3	0	0	0
0.3	7	0	0	0
1	2	0	0	0
3	5	0	0	0
10	2	0	0	0

CUADRO 9. EFECTO DE 2, ISO-PENTENILADENINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALES INORGANICAS DE MURASHIGE Y SKOOG, 3% SACAROSA 170 mg/l  $\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l INOSITOL, 0.4 mg/l TIAMINA $\cdot\text{HCl}$  Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

2, iP mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	5	0	1	1
1	46	3	1	7
3	37	3	1	5
10	25	2	1	5
30	19	2	0	0

CUADRO 10. EFECTO DE 2,ISO-PENTENILADENINA SOBRE EL DESARROLLO DE YEMAS AXILARES DE VAINILLA CULTIVADAS *in vitro*. EL MEDIO DE CULTIVO CONTENIA LAS SALES INORGANICAS DE KNUDSON, 3% SACAROSA Y 0.8% DIFCO BACTO-AGAR. OBSERVACIONES REALIZADAS A LAS 7 SEMANAS DE INCUBACION. CRECIMIENTOS MAXIMOS.

2, iP mg/l	LONGITUD DE BROTE (mm)	No. YEMAS AXILARES FORMADAS	No. RAICES ADVENTICIAS FORMADAS	LONGITUD DE RAIZ (mm)
0	0	0	0	0
1	15	2	0	0
3	11	1	0	0
10	8	0	0	0
30	9	0	0	0

### 5. DISCUSION

La vainilla se propaga de manera natural en forma vegetativa, mediante el desarrollo de las yemas axilares, o sexualmente, por semillas. Para su multiplicación se ha utilizado tradicionalmente la propagación vegetativa por medio de esquejes. En el cultivo in vitro de vainilla, utilizando como inóculos a las yemas axilares, ápices de tallo y secciones de tejidos de tallo, el inóculo que logró desarrollar fueron las yemas axilares. De éstas, las yemas cercanas al ápice presentaron menor desarrollo que las de las regiones media y basal de la planta, lo que indica una posible presencia de dominancia apical. Así también, en relación al tamaño de las yemas se observó un desarrollo más vigoroso y continuo en yemas axilares con tallo que en yemas axilares aisladas. Estos resultados coinciden con la capacidad de crecimiento de las yemas axilares in vivo.

Sobre el estado fisiológico de la planta madre antes de cortar los inóculos, a pesar de no haberse cuantificado los resultados se observó que es determinante para el desarrollo in vitro de los inóculos. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizaron plantas de más de 1,5 m de longitud, vigorosas, de color brillante, sin presencia de manchas o marchitez por deshidratación y con yemas axilares prominentes. El colocar las plantas madre en un cuarto estufa a 27°C, 12 horas luz y 40% de humedad relativa, favoreció el desarrollo del ápice del tallo yemas axilares y mejoró el aspecto general de la planta. Así

también se observó que es preferible utilizar inóculos de plantas enraizadas que de esquejes, ya que las yemas axilares provenientes de plantas enraizadas tienen un desarrollo in vitro más rápido.

Los agentes desinfectantes comunmente utilizados en la técnica de cultivo de tejidos, como lo son el hipoclorito de calcio o el hipoclorito de sodio., en concentraciones de 0.4 a 4% durante 5 a 30 minutos, fueron ineficaces para controlar la contaminación por hongos y bacterias en los cultivos in vitro. Otros desinfectantes utilizados como el fosfato trisódico o la combinación de éste con hipoclorito de calcio. tampoco fueron eficaces para controlar o disminuir la contaminación in vitro. En cambio el uso de bicloruro de mercurio mostró ser efectivo para controlar la contaminación por hongos, pero no la causada por bacterias, especialmente la de los géneros Erwinia o Bacillus.

Las pruebas realizadas para identificar la presencia de agentes contaminantes en los tejidos de hojas y tallo de vainilla, mostraron la presencia de Erwinia en ellos. Las plantas de vainilla utilizadas como material vegetativo provenían de diferentes localidades del municipio de Papantla, Veracruz. A pesar de que la identificación de Erwinia en los tejidos de la planta no se realizó en una muestra representativa de esta zona vainillera, las observaciones sobre la contaminación en los cultivos in vitro y la identificación de Erwinia en éstos nos indica la posibilidad de que el bacilo se encuentre ampliamente difundido en la zona de Papantla. Datos sobre la presencia de Erwinia en los tejidos

de vainilla no han sido reportados en la literatura.

Estos resultados indican que la bacteria es sistémica y por tanto ningún método de desinfestación será eficaz para controlarla y obtener cultivos asépticos. Lo que implica que para propagar in vitro la vainilla, deben obtenerse primeramente cultivos libres del bacilo. De los inóculos utilizados, sólo los ápices de tallo no presentaron contaminación por bacterias; el desarrollo de éstos permitiría obtener cultivos asépticos.

El alto índice de contaminación presentada y por ende el bajo número de muestras que se obtuvieron de cultivos asépticos, no permitieron realizar un análisis cuantitativo de los efectos de los componentes del medio de cultivosales nutritivas y reguladores del crecimiento sobre el desarrollo de los inóculos. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten deducir ciertos efectos generales y a partir de éstos se pueden proponer modelos experimentales más específicos para obtener el método de propagación in vitro de la vainilla.

De los reguladores del crecimiento probados, kinetina, 6-BA y 2, iP, el 6-BA mostró tener mejor efecto sobre el desarrollo de brotes a partir de yemas axilares. Los mejores crecimientos se observaron utilizando 6-BA en una concentración de 1 mg/l. La kinetina, en la misma concentración, tuvo efectos similares, aunque no se observaron diferencias significativas en los crecimientos obtenidos utilizando diferentes concentraciones de esta hormona. El 2, iP tuvo menor efecto sobre el desarrollo de los brotes que el 6-BA o la kinetina, obteniéndose los máximos crecimientos en la concentración de 3 mg/l.

En cuanto al número de yemas axilares formadas in vitro, el mayor número se obtuvo en presencia de kinetina y 6-BA a concentraciones de 1 y 3 mg/l.

En relación a la formación de raíces adventicias in vitro se observaron mejores resultados utilizando las sales inorgánicas de Knudson en presencia de kinetina a concentraciones por debajo de 1 mg/l o en ausencia de reguladores del crecimiento.

En cuanto al efecto de los reguladores del crecimiento sobre el desarrollo del ápice del tallo, el que no se haya obtenido desarrollo alguno puede deberse a la necesidad de combinar la acción de citocininas con auxinas. Así también es posible que los demás componentes del medio de cultivo no fueran los adecuados.

El hecho de que las secciones de tejidos del tallo no hayan formado callosidades cuando fueron sembradas en medios nutritivos conteniendo auxinas, puede deberse a que estos inóculos que era sembrado. Esta secreción posiblemente inhibió la acción de las auxinas, y por tal motivo no se formaron callosidades.

El que no se observaran diferencias en el crecimiento de las yemas axilares cultivadas en el medio de Knudson o en el Murashige y Skoog, puede deberse al hecho de que las orquídeas en plantas con requerimientos poco específicos de nutrientes y por tanto puedan desarrollar in vitro en un medio nutritivo simple como es el de Knudson o en uno con mayor cantidad de sales inorgánicas como es el de Murashige y Skoog.

## 6. CONCLUSIONES.

La vainilla (Vanilla planifolia A.) se puede propagar clonalmente in vitro, utilizando como inóculos yemas axilares con tallo. Como fuente de inóculos deben usarse plantas sanas y vigorosas, de preferencia adaptadas a condiciones de invernadero con temperatura de 27-32°C y no expuestas directamente a los rayos solares.

Para desinfectar el inóculo se propone utilizar el bicloruro de mercurio al 0.1% durante 10 minutos.

La posibilidad de que la mayoría de las plantas madre provenientes del campo y utilizadas como fuente de inóculos estén contaminadas por Erwinia significa que la obtención de cultivos asépticos deberá realizarse a partir del cultivo de ápices del tallo. Para el desarrollo de ápices de tallo se propone utilizar las sales inorgánicas de Knudson o de Murashige y Skoog, probando el efecto de la combinación de citocininas con auxinas.

Una vez obtenidos los cultivos asépticos a partir de los ápices de tallo y desarrollado de brotes, deberán usarse las nuevas yemas axilares como propágulos. Para la multiplicación de propágulos se plantea utilizar las sales de Knudson o de Murashige y Skoog, conteniendo 1 a 3 mg/l de 6-Ba o kinetina bajo condiciones de incubación de 27°C, 16 horas luz y 2000 lux de intensidad lumínica.

Para su enraizamiento los brotes se transplantarán en un medio conteniendo las sales nutritivas de Knudson con 0 a 1 mg/l de

kinetina.

Para la inducción de callosidades se plantea probar inóculos, provenientes de tejidos jóvenes, como sería el caso de protocormos. Así también agregar al medio de cultivo diferentes concentraciones de auxinas solas o en combinación con 6-BA.

Es necesario realizar muestreos de plantas de vainilla en las zonas vainilleras, para determinar las áreas afectadas por Erwinia, su efecto en la producción y métodos de control fitosanitarios.

## 7. RESUMEN

El objetivo del presente fue el desarrollar la metodología de propagación in vitro de la vainilla.

Se utilizarón como inóculos ápices del tallo, yemas axilares y secciones de tejidos del tallo.

Se probaron diferentes métodos de desinfestación para controlar la contaminación por hongos y bacterias, que se presentó hasta en un 100% en los cultivos in vitro. Con bicloruro de mercurio al 0.1% durante 10 minutos se logró controlar hasta en un 100% la contaminación fúngica más no la bacteriana.

Pruebas realizadas para identificar la bacteria contaminante en los cultivos in vitro y en tejidos del tallo y hojas de la planta madre, mostraron la presencia del bacilo Erwinia como agente sistémico en la planta, lo que significa que ningún método de desinfestación será efectivo para erradicar la bacteria.

Los medios básicos nutritivos contenían las sales inorgánicas de Knudson, .3% sacarosa y 0.8% Bacto-Agar, o las sales inorgánicas de Murashige y Skoog, 3% sacarosa, 100 mg/l i-inositol, 0.4 mg/l tiamina  $\cdot\text{HCl}$ , 170 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 0.8% Bacto-agar, suplementados con 6-benciladenina, kinetina o 2, isopenteniladenina en concentraciones de 0 a 30 mg/l.

Los inóculos que mostraron tener desarrollo in vitro fueron las yemas axilares sembradas en el medio básico de Knudson o de Murashige y Skoog con 1 mg/l de 6-benciladenina o de kinetina

incubadas a 27°C, con 16 horas luz y 2000 lux de intensidad lumínica. Para enraizamiento los mejores resultados se obtuvieron utilizando las sales de Knudson conteniendo 0.3 mg/l de kinetina o sin reguladores del crecimiento.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Arekal, G.D. and K.A. Karanth, 1978. In vitro seed germination of Zeuxine strateumatica Schlr. (= Z. sulcata Syndley).  
Orchidaceae. Current Science. 47: 552-553.
- Arditti, J.E. Ball and D.M. Reisinger, 1977. Culture of flower stalk buds:  
A method for vegetative propagation of Phalaenopsis. Amer  
Orchid Soc. Bull. 46: 236-241.
- Champagnat, M., Morel, G. Chabut, P., Cogner, A.M., 1966 Recherches  
Morphologiques et Histologiques sur la multiplication vegetale  
de quelques orchidees du genre Cymbidium. Rev.Gen. Botan.  
73: 706-746.
- Champagnat, M., 1977. Culture de Bourgeons et multiplication vegetative  
des orchidees. pp. 238-253. En "La Culture des Tissus et des  
Cellules des Vegetaux". Ed. R.J. Gauthered. Masson.
- Chennaveeraiah, M.S. and S.J. Patil, 1974. Morphogenesis in seed cultures  
of Spathoglottis plicata (Orchidaceae). Current Science. 44:  
68.
- Chong J.G. and L.L. Hua, 1978. Effects of growth regulators on morphogene-  
sis of orchid callus tissues. Plant Physiol. 61:259

- Churchill, M.E., Ball, E.A., Arditti, J., 1970 Production of Orchid plants from seedling leaf tips, Orchid Dig. 34: 271-273
- Cuspinera G.J., 1947 Estudio agroeconómico de la vainilla. Tesis. ENA.
- Ernst, R. 1967 a. Effect of select organic nutrient additives on growth in vitro of Phalaenopsis seedlings. Amer Orchid Soc. Bull. 36: 694-704
- Ernst, R. 1967 b. Effect of carbohydrate selection on growth rate of freshly germinated Phalaenopsis and Dendrobium seeds. Amer Orchid Soc. Bull. 36: 1068-1073.
- Ernst, R., Arditti, J. and Healey, P.L., 1970 The nutrition of orchid seedlings. Amer. Orchid Soc. Bull. 39: 599-605,691-700
- Ernst, R. and V.C. Irving, 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of Paphiopedilum. Amer. Orchid. Soc. Bull 43: 35-38
- Farrar, M.D., 1963. Growing orchids seedlings. Amer. Orchid Soc. Bull. 32: 888-891.
- Hartmann, H.T. and E.E. Kester, Plant Propagation Principles and Practices pp. 509-532 Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey 3rd. Edition

Harrison, C. And. J. Arditti, 1970. Growing orchid from seeds. The Orchid Dig. 7: 199-204.

Heller, R., 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux cultivées in vitro, Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14: 1-223

Hirsch, D.H., 1959. Gibberelattas: stimulant for *Cattleya* seedlings in flasks. Amer. Orchid oc. Bull. 28- 342-344.

Ichihashi, S. and S. Kako, 1973. Studies on clonal propagation of Cattleya through tissue culture method. I. Factors affecting survival and growth of shoot meristem of Cattleya in vitro J. Japan Soc. Hor. Sci: 42: 264-270.

Ichihashi, S. and S. Kako, 1977. Studies on clonal propagation of Cattleya through tissue culture method. II Browning of Cattleya J. Jap. Soc. Hort Science. 46: 325-330.

Ichihashi, S., 1978 Studies on the media for orchid seed germinatio. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 46: 521-529

Ichihashi, S., 1979. The effects of total ionic concentration cation/anion ratio,  $\text{NH}_4^+$  /  $\text{NH}_3^-$  ratio and minor elementos on the growth of Bletilla striata. J. Japan Soc. Hort. Sci. 47: 524-536

- Intuwong , O., Kunisaki, J.T., Sagawa, Y., 1972. Vegetative propagation of Phalaenopsis by flower stalk cuttings. Na Okika of Hawaii 1: 13-18
- Intuwong, O. and Sagawa, Y., 1973. Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescences. Amer. Orchid Soc. Bull. 42: 209- 215
- Intuwong, O. and Sagawa, T., 1974. Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot tip culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 43:893-895.
- Intuwong, O. and Y. Sagawa, 1975. Clonal propagation of Dendrobium golden wave and other nobile types. Amer. Orchid Soc. Bull. 44: 319-322
- Kim, K.K., J.Y. Kunisaki and Y. Sagawa, 1970. Shoot tip culture of Dendrobiums. Amer. Orchid Soc. Bull. 39: 1077-1080.
- Knudson, L., 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 15: 214-217
- Knudson, L., 1951. Nutrient solution for orchids. Botan Gaz. 112: 258-232
- Kotomori, S. and T. Murashige, 1965. Some aspects of aseptic propagation of orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 34: 484-489

- Kunisaki, J.T., K.K. Kim and Y. Sagawa, 1972. Shoot tip culture of Vanda. Amer. Orchid Soc. Bull. 41: 430-439
- Kusomoto, M. and J. Furukawa, 1977. Effect of organic matter in the growth of Cymbidium protocorms cultured in vitro J. Jap. Soc. Hort. Sci. 45: 421-426
- Kusomoto, M., 1978. Effects of combination of growth regulation substances and of organic matter on the proliferation and organogenesis of Cymbidium protocorms cultured in vitro. J. Japan Soc. Hort, Sci 47: 391-400
- Kusomoto, M., 1979. Effects of combination of growth regulators and of organic supplements on the proliferation and organogenesis of Cattleya protocorm like bodies cultured in vitro. J. Japan Soc. Hort. Sci. 47: 501-510.
- Kusomoto, M., 1979 b. Effects of combination of growth regulators and of organic supplements on the growth of Cattleya plantlets cultures in vitro. J. Japan Soc. Hort. Sci. 47: 492-501
- Lindemann, E.G., J.E. Gunckel and O.W. Davidson, 1970. Meristem culture of Cattleya. Amer. Orchid Soc. Bull. 39: 1002-1004.
- Loh, C.S., A.N. Rao and C.J. Goh, 1975, Clonal propagation from leaves in the orchid Aranda. Singapore Natl. Acad. Sci. 4: 97-99

- Marston, M.E., 1967. Vegetative propagation of plants using tissue culture techniques. Nottingham Univ. School of Agr. Report 77-80
- Martin, C., 1977. La culture de meristems. pp. 222-231. En "La Culture des Tissus et des Cellules des Vegetaux". Ed. R.V. Gautheret. Mason
- Mitra, G. C., 1971. Studies on seeds, shoot tips and stem discs of an orchid grown in aseptic culture. Indian J. Exp. Biol. 9: 79-85
- Morel, G., 1964. Tissue culture- A new means of clonal propagation in orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 33: 473-478
- Morel, G., 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymbidium Soc. News. 20: 3-11
- Mosich, S.K., E.A. Ball and J. Arditti, 1975. Clonal propagation of Dendrobium by means of node cultures. Amer Orchid Soc. Bull 44: 1055-1061
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murashige, t., 1977. The impact of plant tissue culture on agriculture pp. 15-26. en: "Frontiers of Plant Tissue Culture". Ed T.A. Thorpe. I.A.P.T.C.

- Nag, K.K. and B.N. Johri, 1970. Effects of cytokinina and injury on the formation of shoot buds by leaves of Dendrophthoe falcata. *Planta* 90: 360-364
- Ortiz, L.O., 1945 El cultivo de la vainilla. Tesis. ENA.
- Purseglove, J.W., 1972. Tropical Crops Monocotyledons 2. Longman Group Limited. London.
- Ramírez, B.F., 1968. Aspectos económicos del financiamiento, producción y mercado de la vainilla en México. Tesis IPN.
- Rosa, M.D., and V. Laneri, 1977. Modification of nutrient solution for germination and growth in vitro of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 46: 813-820
- Rudolph, M.J., E.A. Ball and J. Arditti, 1972. Tissue culture of orchids. III. Dose orthochlorophenoxyacetic acid select for or induce anthocyanin production? *Amer. Orchid Soc. Bull.* 41: 1074-1078.
- Rucker, W., 1974. Influence of cytokinins on growth and differentiation of *Cymbidium* protocorms cultivated in vitro. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie.* 72: 338-351.
- Sagawa, Y. and H.L. Valmayor, 1966. Embryo culture of orchids. In DeGarmo, L.R. (ed): *Proc. 5th World Orchid Conf.* pp. 99-101 Long Beach.

- Sánchez, R.A.A., 1980. Viabilidad de la explotación de la vainilla. Facultad de Economía, UNAM. México. Tesis.
- Scully, R.M., 1965. Stem propagation of Phalaenopsis. Bull. Pacific Orchid Soc. 23: 13-16
- Scully, R.M., 1966. Stem propagation of Phalaenopsis. Amer. Orchid Soc. Bull 35: 40-42
- Scully, R.M., 1967. Aspects of meristem culture in Cattleya alliance. Amer Orchid Soc. Bull. 36: 103-108.
- Singh, H. and Y Sagawa, 1972. Vegetative propagation of Dendrobium by flower stalk cuttings. Na Okika of Hawaii. 1: 19.
- Skoog, F. and C.O. Miller, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Svmp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.
- Stewart, F.C. and M.O. Mapes, 1971. Morphogenesis in aseptic cultures of Cymbidium. Botan. Gaz. 132: 65-70.
- Stewart J. and J. Button, 1976. Rapid vegetative multiplication of Epidendrum O'brienianum in vitro and in the green house. Amer Orchid Soc. Bull. 45: 922-310.

- Stewart J. and J. Button, 1978. Development of callus and plantlets from Epidendrum root tips cultured in vitro. Amer. Orchid Soc. Bull 47: 607-612.
- Stoltz, L.P., 1979. Iron nutrition of Cattleya orchid grown in vitro. Amer Soc. Hort. Sci. 104: 308-310
- Teo, C.K.H. and P.S. Teo 1974. Clonal propagation of orchids by tissue culture, Planter 50: 213-216
- Teo, C.K.H., 1978. Clonal propagation of Haemaria discolor by tissue culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 47: 1028-1030
- Thompson, R.T., 1971. Excision of a Cymbidium meristem photographed in color. Amer Orchid Soc. Bull 40: 580-584.
- Vacin, E.F. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110: 605-613.
- Vacherot, M., 1977. Georges Morel et la multiplication des Orchidees. pp. 254-258. En "La Culture des Tissus et des Cellules des Vegetaux". Ed. R.J. Gautheret, Masson.
- Wang, P.J. and L.C. Huang, 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. In Vitro. 12: 260-262.

Weaver, R.J., 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas, la Ed. México.

Wilfret, G.J., 1966. Formation of protocorm-like bodies of excised Cymbidium shoot tips. Amer. Orchid Soc. Bull 35: 823-827.

White, P.R., 1963 The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2nd Ed.  
Ronald Press Co.

Wimber, D.E., 1963. Clonal multiplication of Cymbidium through tissue culture of the shoot meristem. Amer. Orchid Soc. Bull 32: 105-107

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA