



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

EFFECTO DE LA VARIACION DE INSUMOS EN EL  
MEDIO DE CULTIVO PARA LA PROPAGACION  
*IN VITRO* DE VAINILLA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**INGENIERO AGRICOLA**

**P R E S E N T A :**

**JOSE ARTURO DE LUCAS ARBIZA**

ASESORES: M.C. LAURA BERTHA REYES SANCHEZ  
M.C. JUAN ROBERTO GUERRERO

CUAUTILAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2005

m340565



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**  
**UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES  
CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Efecto de la Variación de Insumos en el Medio de Cultivo  
para la Propagación in vitro de Vainilla.

que presenta el pasante: José Arturo de Lucas Arbiza  
con número de cuenta: 40005030-6 para obtener el título de :  
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de noviembre de 2004.

PRESIDENTE	<u>M.C. Laura Bertha Reyes Sánchez</u>	
VOCAL	<u>Biol. Armando Lugo Sotelo</u>	
SECRETARIO	<u>Biol. Elva Martínez Holguín</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.C. Francisco Cruz Pizarro</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Minerva Chávez Germán</u>	

# Índice

1.	<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	<i>I</i>
2.	<i>OBJETIVOS</i> .....	<i>3</i>
2.1	Objetivo general.....	<i>3</i>
2.2	Objetivos específicos.....	<i>3</i>
3.	<i>REVISIÓN DE LITERATURA</i> .....	<i>4</i>
3.1.	Propagación in vitro de vainilla.....	<i>4</i>
3.2	Importancia del medio de cultivo.....	<i>5</i>
3.2.1	Sales minerales.....	<i>5</i>
3.2.2.	Fuentes de Carbono.....	<i>10</i>
3.2.3.	Vitaminas.....	<i>11</i>
3.2.4.	Reguladores de crecimiento.....	<i>12</i>
3.2.5.	Agentes gelificantes.....	<i>15</i>
3.2.6.	Agua.....	<i>17</i>
3.2.7.	pH.....	<i>17</i>
3.2.8.	Otros componentes.....	<i>18</i>
3.3	Medios de cultivo.....	<i>18</i>
3.3.1	Morfogénesis.....	<i>22</i>
3.4.	Consistencia del medio.....	<i>23</i>
3.4.1.	Medio semi-sólido.....	<i>23</i>
3.4.2.	Medio líquido.....	<i>24</i>
3.5.	Insumos de bajo costo en la micropropagación.....	<i>25</i>
4.	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	<i>28</i>
4.1	Ubicación de la investigación.....	<i>28</i>
4.2	Material experimental.....	<i>28</i>
4.3	Condiciones de cultivo.....	<i>28</i>
4.4	Diseño experimental.....	<i>28</i>
4.5	Diseño experimental.....	<i>30</i>
4.5.1	Variables evaluadas.....	<i>30</i>
5.	<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	<i>32</i>
5.1	Número de brotes.....	<i>32</i>
5.2	Longitud de brotes.....	<i>36</i>
6.	<i>CONCLUSIONES</i> .....	<i>41</i>
7.	<i>Anexo 1 : Cuadros</i> .....	<i>42</i>
8.	<i>Anexo 2 : Gráficos</i> .....	<i>42</i>
9.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	<i>43</i>

## 1. INTRODUCCIÓN.

La vainilla es considerada el saborizante de mayor importancia en el ámbito mundial. Su uso se distribuye en diversas industrias como la alimentaria, licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética y tabacalera. La vainilla es la segunda especia más cara que se comercializa en el mercado internacional (después del azafrán). Su precio internacional ha tenido un considerable incremento en los últimos 5 años, llegando a un máximo en el 2003, en que alcanzó los 400 dólares americanos el kilogramo, luego de lo cual disminuyó en el 2004 a 350 dólares. Para el ciclo 2000 - 2001, el precio en México de vainilla beneficiada fue en promedio de 135 dólares por kilogramo y el de vainilla verde de 10 dólares por kilogramo. Gracias a estos elevados precios, de acuerdo con la Organización para la Alimentación y Agricultura (FAO), la superficie mundial destinada al cultivo de vainilla registró un crecimiento del 13.2% ente 1995 y 2000. (Claridades Agropecuarias, 2002)

Tradicionalmente la vainilla es propagada por medio de estacas; sin embargo, éste no es un método económico ya que la recolección de cortes del tallo que se obtiene a partir de plantas madre, impide que éstas puedan ser aprovechadas para la producción. Por otro lado, es difícil cubrir la demanda de plantas por medio de esta técnica, por lo que la micropropagación ha sido adoptada en los últimos años (Geetha y Sudheer, 2000). En la actualidad, debido a la alta rentabilidad de la vainilla, existe mucha demanda de los productores por establecer plántula de vainilla proveniente de los laboratorios.

Otro gran problema en la producción de este cultivo ha sido el desarrollo de una enfermedad ocasionada por el hongo *Fusarium*, el cual ha causado grandes pérdidas a los productores. En la década de los 90 en Quepos, Costa Rica, la vainilla establecida fue diezmada por esta enfermedad, causando casi la desaparición del cultivo en esa zona. En este sentido, las técnicas biotecnológicas han contribuido de sobremanera a solucionar este problema, aportando híbridos propagados *in vitro*, y produciendo plántulas libres del hongo, lo que ha propiciado la utilización de plantas sanas obtenidas mediante éste procedimiento.

Existe por tanto la necesidad de producir plantas mediante técnicas biotecnológicas sustentables como lo es la micropropagación; sin embargo, el alto costo de los medios de cultivo utilizados representa una de las limitaciones de esta técnica, lo que obliga a la búsqueda de métodos de sustitución de los componentes convencionales utilizados como medio de cultivo, por insumos de bajo costo y de fácil adquisición en las regiones donde se cultiva. En este sentido, los medios líquidos pueden ser una opción, ya que tienen la característica de promover una alta tasa de crecimiento además de tener un menor costo de producción gracias a la ausencia de agente gelificante, que son los que encarecen los costos de producción de las plantas *in vitro*.

Por lo anterior, en esta investigación se utilizaron insumos como lo son las sales hidropónicas y vitaminas de consumo humano de fácil adquisición en la zona de estudio que fue el Instituto Tecnológico de Costa Rica ubicado en San Carlos, y se compararon con el medio Murashige y Skoog (1962).

Existen muy pocos trabajos realizados en la micropropagación masiva a bajo costo; sin embargo, en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales de la Escuela de Agronomía, de la Regional San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), se han realizado con anterioridad trabajos en cultivos como el ñampi (*Colocacia sculenta*), vainilla (*Vanilla planifolia*), jengibre (*Zingiber officinale*), yuca (*Manihot sculenta*), raicilla (*Psychotria ipacuacuanha*), banano (*Musa* sp.) y diversas especies de orquídeas, utilizando el mismo tipo de insumos que en la presente investigación, pero en medios semisólidos con gelificantes a base de almidón de maíz, habiéndose obtenido una disminución de hasta el 20% de los costos (Palma y Montero, 2002).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo general***

Evaluar el efecto de dos medios en la brotación de callos de vainilla in Vitro en semisólido y líquido.

### **2.2 *Objetivos específicos***

- Analizar la respuesta en brotes por acción de los medios de cultivo.
- Analizar el efecto en la diferenciación y crecimiento de los brotes.
- Determinar cual concentración de sales y que consistencia del medio genera la mejor respuesta.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA.

#### 3.1. *Propagación in vitro de vainilla.*

Unos de los primeros reportes en el cultivo *in vitro* de vainilla es el que realizaron G. Bouriquet (1947) y Knudson (1950), los cuales lograron la germinación *in vitro* de semillas de vainilla en un medio de cultivo. Knudson (1950) describió en su trabajo el proceso de germinación *in vitro* en correlación con el proceso en invernadero, encontrando que la obtención de plántulas fue posible si las semillas se colocan en un medio de cultivo dentro de un incubador a 32 °C y oscuridad total, viéndose aumentado el porcentaje de germinación si antes, dichas semillas, eran sometidas a condiciones de invernadero (Krikorian, 1994).

Kononowicz (1984) reportó la proliferación *in vitro* de brotes de vainilla a partir de yemas axilares en los que empleó un medio básico Murashige y Skoog (1962), suplementado con 0.1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mg l<sup>-1</sup> de pirodoxina y 100 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol, obteniendo mejores resultados con una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina.

En investigaciones posteriores, la propagación *in vitro* de *Vanilla planifolia* se ha realizado en cultivo de callos (Gu *et al.*, 1987; Davidonis and Knorr, 1991), ápices de raíces aéreas (Philip y Nainar, 1986 y 1988a), ápices de yemas axilares (Jarret and Fernández, 1984; George and Ravishankar, 1997), y embriones maduros e inmaduros (Parra, 1987; Philip y Nainar, 1988 b) utilizando diferentes medios de cultivo.

George and Ravishankar (1997) y Philip y Nainar (1988 b) utilizaron un medio líquido MS para la obtención de brotes obteniendo mayor número de estos que en un medio solidificado con agar.



### **3.2 Importancia del medio de cultivo.**

El objetivo del medio de cultivo es suministrar al explante todos los nutrimentos requeridos para el crecimiento. Ramage y Williams (2002) reafirman su gran importancia principalmente en citocininas y auxinas para la inducción de callo, multiplicación y formación de órganos en un gran número de especies; sin embargo, hacen notar la importancia de la nutrición mineral para el desarrollo y crecimiento vegetal en relación a una posible reducción de las concentraciones de reguladores de crecimientos requeridos para ello. A su vez, Gamborg *et al.* (1976), indican que el éxito en el cultivo de tejidos depende en gran medida de la selección del medio de cultivo adecuado, lo que por supuesto incluye su composición química y su forma física.

#### **3.2.1 Sales minerales.**

Cualitativamente, los medios de cultivo aportan los mismos elementos minerales (macro y micro elementos) que se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas (Roca *et al.* 1991). Un mineral esencial es definido como aquel que es crítico o indispensable para una planta para completar su ciclo de vida (Ramage y Williams, 2001). Para poder ser considerado como esencial, un mineral debe contar con tres características: (1) ser requerido obligatoriamente para el crecimiento y reproducción; (2) no poder ser sustituido por otro mineral o sustancia; y (3) tener una influencia directa o indirecta en el metabolismo de la planta (Ramage y Williams, 2001).

Los nutrimentos minerales esenciales se clasifican en dos grupos, macro y micronutrimentos, dependiendo de la cantidad del elemento requerido para el crecimiento vegetal.

#### ***Macronutrimentos***

Los elementos pueden desempeñar tres papeles distintos en las plantas: electroquímicos, estructurales y catalíticos. El electroquímico incluye el balance de las concentraciones iónicas, la estabilización de macromoléculas, neutralización de cargas y otros. El papel estructural lo desempeñan los elementos incorporados a la estructura química de moléculas

biológicas, o que se usan en la síntesis de polímeros estructurales. Los roles catalíticos corresponden a elementos involucrados en los sitios activos de las enzimas.

De la misma manera, estos elementos tienen gran importancia en el desarrollo *in vitro*, ya que sin aporte de ellos no se podría lograr el mantenimiento, desarrollo y proliferación de los tejidos. Cada uno tiene una función específica dentro de la micropropagación (Jiménez, 2004). A continuación se mencionan algunas de las funciones más importantes que cumplen los diferentes macroelementos en las plantas:

a. *Nitrógeno* (N). Este elemento es de gran importancia, ya que es uno de los constituyentes de las moléculas proteicas; también se encuentra en otras de gran importancia como son las purinas y pirimidinas, las cuales forman parte de los ácidos nucleicos (DNA, RNA), esenciales para la síntesis de proteínas (Devlin, 1980).

En los medios de cultivo, las fuentes más utilizadas para proporcionar nitrógeno son el nitrato inorgánico ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), ya sea en forma conjunta o individual (Endress, 1994), siendo el amonio el más rápidamente asimilado en comparación con otras fuentes de nitrógeno como el nitrato (Brand, 1993).

Existe una gran cantidad de estudios referentes a los efectos de este elemento *in vitro*, así por ejemplo, Singha *et al.* (1990), mencionan que altos niveles de  $\text{NH}_4^+$  algunas veces se relacionan con procesos de hiperhidricidad. Por otro lado, se ha descubierto una estrecha relación entre la concentración total de nitrógeno en el medio y la proporción entre  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  con el desarrollo de embriones somáticos (Jiménez, 2004), a la vez que dichos autores encontraron una alta regeneración de raíces en medios de cultivo con bajos niveles de nitrógeno. Ramage y Williams (2002) mencionaron que las aplicaciones localizadas de nitrato, amoniaco y fósforo inorgánico estimulan el crecimiento de raíces en cebada.

Autores como Seiskandarajah *et al.* (1990) sugirieron que la proporción entre nitrato de amonio y nitrato de potasio influye en la formación de brotes adventicios a partir de hojas de manzana. Tal parece que niveles crecientes de este elemento y algunos aminoácidos, incrementan significativamente, tanto la inducción y crecimiento de callos, como la habilidad regenerativa (Elkonin y Pakhomova, 2000). Un efecto parecido ha sido

documentado por Shimasaki y Uemoto (1990), los cuales comprobaron que para la formación adecuada de raíces a partir de rizomas en *Cymbidium*, se necesitan cantidades reducidas de nitratos de amonio y potasio (Jiménez, 2004).

El nitrato es la principal fuente de nitrógeno para el cultivo de tejidos vegetales, de acuerdo a Ramage y Williams (2002), y de hecho en muchos estudios ha constituido exitosamente la única fuente de nitrógeno para la morfogénesis.

En contraposición, cuando el ión amonio es utilizado como la única fuente de nitrógeno parece tener un efecto negativo en la morfogénesis; aunque a la vez, muchos estudios han mencionado que existen plantas capaces de tolerar el amonio de igual manera que al nitrato, como es el caso del arroz. Así mismo, se ha demostrado que el amonio se puede volver tóxico a los tejidos de las plantas, cuando su concentración en el tejido se vuelve elevada (Brand, 1993); pero en contraste, otros estudios han demostrado que cultivos de células pueden proliferar en medios con ión amonio como única fuente de nitrógeno, si el pH del medio se ajusta durante el periodo del cultivo, y el proceso se lleva a cabo en ausencia de algún ácido orgánico (Ramage y Williams, 2002).

Otro factor importante de la nutrición nitrogenada es la influencia que tiene la utilización preferente del  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  por el explante, por lo que la cantidad de nitrógeno disponible puede ser de menor importancia en la morfogénesis que la relación entre el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{NH}_4^+$ , como lo determinaron Ramage y Williams (2002).

b. *Fósforo (P)*. Es un elemento formador de la parte estructural de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas NAD y NADP; desempeñando también una función indispensable en el metabolismo energético, en donde la elevada energía de la hidrólisis del pirofosfato y de diversos enlaces de fosfato orgánico (ATP) se utilizan para el balance de la nutrición fosforada de cultivos *in vitro*.

Es importante para el crecimiento del explante y el desarrollo de su morfogénesis, siendo como fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) la forma en que este elemento es comúnmente agregado a los medios de cultivo (Endress, 1979); al respecto de las concentraciones de fósforo a utilizar en el medio, existe un estudio realizado por Ramage y Williams (2002), en el que estos autores

reportan haber obtenido el máximo número de brotes con las concentraciones de fosfato estándar del medio Murashige y Skoog (1962), ya que medios con mayores concentraciones de este ión, pueden generar precipitados y posiblemente limitar la disponibilidad de otros minerales como el  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo un menor número de brotes.

c. *Calcio* ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Una de sus principales funciones es la síntesis de pectina en la lámina media de la pared celular, pero también está involucrado en el metabolismo, formación del núcleo y de las mitocondrias (Bidwell, 1979). Por otro lado, actúa como inhibidor en la síntesis de enzimas relacionadas con los procesos de glucólisis, deposición de fosfolípidos y proteínas dentro o fuera de la membrana plasmática (Endress, 1994).

Ramage y Williams (2002) señalaron que Jensen *et al.* (1990) reportaron un incremento de casi el doble en el número de embriones somáticos cultivados en suspensiones en *Daucus carota*, debido al incremento en la concentración de calcio en el medio, indicando de igual manera, que este incremento en la concentración de calcio se contrapone al efecto inhibitorio del 2,4-D en la embriogénesis somática.

Un fenómeno que se ha logrado observar es que aumentando la concentración de calcio en el medio se puede prevenir tanto la necrosis de la punta de los brotes como la hiperhidricidad, lo cual se puede deber a los efectos osmóticos, reguladores de crecimiento o nutricionales del calcio (Pescaletto *et al.*, 1988; Sha *et al.*, 1985; Singah *et al.*, 1990); habiéndose propuesto la ausencia de calcio como un factor limitante en el cultivo de tejidos (Ramage y Williams, 2002).

d. *Magnesio* ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Dos funciones esenciales para las plantas como son la fotosíntesis y el metabolismo glucídico se realizan gracias a la presencia del ión magnesio, el cual forma parte tanto de la estructura química de la clorofila como de varias enzimas que intervienen en el metabolismo glucídico (Devlin, 1980). Bidwell (1979) mencionó que este elemento parece estar implicado en la estabilización de partículas ribosómicas al enlazar las subunidades que forman el ribosoma, así como en la ligadura de enzima con sustrato, por ejemplo en reacciones que implican transferencia de fosfato desde el ATP.

e. *Potasio* ( $K^+$ ). Este elemento es requerido en gran cantidad por las plantas, ya que desempeña varios papeles catalíticos, los que en su mayoría aún no están claramente definidos (Bidwell, 1979). Es un elemento esencial como activador de enzimas que intervienen en la síntesis de ciertas uniones en el metabolismo peptídico (Devlin, 1980), siendo las regiones meristemáticas de las plantas las zonas donde se encuentran las concentraciones más elevadas de este ión.

El potasio tiene también influencia en el flujo de otros minerales como el nitrógeno, el carbono y el fósforo además de actuar incrementando la traslocación de fotosintatos (Ramage y Williams, 2002). Fischella *et al.* (2000) mencionaron que las bajas concentraciones en suspensiones celulares en zanahoria silvestre disminuyen la formación de embriones somáticos.

Por otro lado, la importancia del papel del potasio es mayormente aclarada por los reportes de Ramage y Williams (2002), quienes observaron que el aumento en la concentración de potasio resultó en la supresión de la morfogénesis, en tanto que Brand (1993), encontró que el potasio tiene relación con el efecto de hiperhidricidad cuando este elemento se encuentra en niveles bajos; y que por arriba de la concentración del medio MS la tasa de crecimiento del cultivo disminuía.

f. *Azufre* (S). El azufre es absorbido por la planta como ión sulfato ( $SO_4^-$ ) (Devlin, 1980). Es un elemento con funciones más específicas al ser integrante de aminoácidos sulfurados como cisteína, cistina y metionina; siendo por tanto, un importante constituyente de las proteínas, así como de algunos compuestos de gran actividad biológica como el glutatión, la biotina, la tiamina y la coenzima A (Bidwell, 1979).

### ***Micronutrientes***

Los microelementos como el hierro, manganeso, cobre, molibdeno, iodo, boro, cobalto y níquel son considerados cofactores e inductores de síntesis de enzimas (Endress, 1994) teniendo, por tanto, una función catalítica. Estos elementos sólo son requeridos en cantidades mínimas (Bidwell, 1979), habiendo sido ya demostrado que los

micronutrientes incrementan significativamente la regeneración *in vitro* (Ramage y Williams, 2002).

a. *Hierro* ( $\text{Fe}^{3+}$ ). El hierro es el microelemento que se requiere en mayor cantidad, por lo que ha sido considerado en muchas ocasiones como un elemento mayor. Su importancia radica, por un lado, en el hecho de ser parte del sitio catalítico de muchas enzimas óxido-reductoras importantes y, por el otro, a su papel esencial para la formación de la clorofila (Bidwell, 1979).

Este elemento no puede ser directamente aprovechado de manera satisfactoria en el medio de cultivo, por lo que es necesario agregarlo a través de fuentes más complejas en forma de EDTA (ácido etilendinitilotetraacético) (Endress, 1994).

b. *Otros elementos*. Algunos de estos elementos tienen una función catalítica como es el caso del manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ), que es un activador de enzimas que intervienen en el metabolismo del nitrógeno y en la función respiratoria; el zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), que interviene en la síntesis de la auxina IAA; el Cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), que es parte importante de enzimas como las fenolasas, la lacasa y de la oxidasa del ácido ascórbico, en tanto que el molibdeno ( $\text{Mo}^{4+}$ ) tiene un efecto sinérgico con el nitrógeno, ya que es reductor de nitratos y actúa fijando a este elemento.

En cuanto al papel desempeñado por otros micronutrientes, es relevante mencionar que en la propagación *in vitro* se ha encontrado que elementos como el níquel y el cobalto ayudan a estimular la morfogénesis en callo de *Daucus carota* (Ramage y Williams, 2002) y que el incremento en la concentración de  $\text{CuSO}_4$  en el medio incrementa la regeneración de brotes de callo. (Ramage y Williams; citado por Ramage y Williams, 2002).

### **3.2.2. Fuentes de Carbono.**

La mayoría de los cultivos *in vitro* son heterótrofos debido a que las condiciones son poco apropiadas para la fotosíntesis, siendo ésta la razón por la que es necesario agregar una fuente de carbono al medio (Pierik, 1990; Roca y Morginski, 1991).

Los azúcares son las fuentes de carbono utilizadas, siendo la sacarosa (en concentraciones del 2 al 5 %) la más frecuentemente incluida en los medios de cultivo ya que ésta es sintetizada y transportada naturalmente por las plantas. En el cuadro 1 se pueden observar algunos de los azúcares más utilizados en la micropropagación.

**Cuadro 1.** Fuentes de carbono utilizadas para el cultivo *in vitro* de plantas

Comúnmente utilizados	Escasamente utilizados
Glucosa	Lactosa
Sacarosa	Galactosa
Glicerol	Melaza
Pentosa	Almidón de papa
-----	Almidón de cereal

Fuente. Modificado de Endress. 1994.

La sacarosa que se encuentra en venta de manera comercial, resulta adecuada para el medio ya que se trata de un producto purificado el cual, según los análisis de los productores, se compone de 99.94% de sacarosa, 0.02% de agua y 0.04% de otras sustancias (Pierik, 1990).

Kodym y Zapata-Arias (2001) probaron diferentes tipos de azúcares comerciales, oscuras y claras junto con la sacarosa nivel reactivo, sin encontrar diferencias en las tasas de micropropagación.

### 3.2.3. Vitaminas.

Las vitaminas son compuestos orgánicos que, a bajas concentraciones, desempeñan en el metabolismo celular funciones catalíticas y reguladoras (Devlin, 1980).

Las plantas, al ser organismos autótrofos, son capaces de sintetizar las vitaminas necesarias para su crecimiento; sin embargo, según las investigaciones hechas con explantes que se desarrollan *in vitro*, aparentemente es necesario adicionar de manera

exógena algunos de estos compuestos, tal es el caso de vitaminas del grupo B (piridoxina-HCl, ácido nicotínico, tiamina-HCl), glicina (Endress, 1994). Por otro lado, Kirkorian (1991), menciona que los aditivos mínimos esenciales son la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina, aunque se cree que solamente la inclusión de la tiamina al medio sea esencial para el desarrollo del explante (Roca y Morginski, 1991; Kirkorian, 1991).

a. *Tiamina* (B<sub>1</sub>). Su presencia tiene importancia en el metabolismo celular actuando como coenzima en la descarboxilación de los  $\alpha$ -cetoácidos (Devlin, 1980). Se sabe que las puntas radicales escindidas son incapaces de sintetizarla y que en el cultivo de tejidos tiene efecto en el estímulo del crecimiento de raíces, habiendo sido igualmente demostrado que su uso resulta adecuado para la inducción de callo (Jiménez, 2004).

b. *Ácido Nicotínico* (B<sub>3</sub>). En general se encuentra formando parte del NADP y del NAD (Devlin, 1980). Glaston (citado por Devlin, 1980) reportó que la vitamina B<sub>3</sub> tiene un efecto sinérgico con el IAA para la estimulación de raíces laterales.

c. *Piridoxina* (B<sub>6</sub>). Almenstrand (citado por Devlin, 1980), observó una disminución de la actividad meristemática de raíces aisladas debida a la deficiencia de B<sub>6</sub>, a la vez que se cree que también puede participar en la síntesis de triptofano y ácido nicotínico.

La glicina, uno de los primeros aditivos orgánicos, se considera actualmente dañino, y el inositol, por sí sólo o en combinación con otros compuestos, estimula la división celular. Otras vitaminas como el ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina pueden ser útiles pero no absolutamente necesarias. De igual forma, el ácido ascórbico puede ser benéfico por su capacidad de actuar como agente reductor y retrasar la formación de sustancias que inhiben el crecimiento (Kirkorian, 1991).

### **3.2.4. Reguladores de crecimiento.**

Los reguladores de crecimiento pueden encontrarse de manera natural como hormonas, o ser de origen sintético, y tener una actividad semejante a los primeros. Pierik (1990) define a las hormonas vegetales como aquellos compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores que influyen sobre su crecimiento y desarrollo, actuando generalmente en



lugares diferentes a aquél en que fueron producidos y en el que se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas.

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores de crecimiento son de vital importancia ya que sin éstos es casi imposible el crecimiento y desarrollo de los explantes; aunque sí se han encontrado casos en los que se puede obtener el resultado deseado en ausencia de éstos (Roca y Morginski, 1991). Las auxinas y las citocininas, específicamente, juegan un papel muy importante en este tipo de cultivos y la adición de una auxina o citocinina dependen del tipo de explante y especie vegetal (Pierik, 1990).

### ***Auxinas.***

Son sustancias capaces de producir alargamiento celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhibición de la formación tanto de vástagos axilares como adventicios y, frecuentemente, embriogénesis en los cultivos en suspensión. A bajas concentraciones predomina la formación de raíces adventicias y a altas la formación de callo (Pierik, 1990; Krikorian, 1991).

Entre las sustancias utilizadas encontramos tanto a aquellas de origen natural, como el ácido indolacético (IAA) de baja actividad y altamente fotosensible, y de igual manera, encontramos a aquellas producidas de manera sintética, las cuales producen un efecto fisiológico similar como son: el ácido indolbutírico (IBA), el ácido neftalenácético (NAA) y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Al respecto, Pierik (1990) recomienda limitar la utilización del 2,4-D al máximo ya que éste puede inducir mutaciones, además de inhibir la fotosíntesis.

Generalmente sólo se utiliza una auxina en el medio basal, aunque algunos investigadores han utilizado simultáneamente el 2,4-D y NAA ya que parece que varias auxinas tienen diferentes sitios de acción.

### ***Citocininas.***

Son sustancias que promueven el crecimiento y desarrollo estimulando la división celular, sobre todo, cuando se encuentran en compañía de una auxina (Pierik, 1990). En

concentraciones elevadas ( $1-10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pueden inducir la formación de vástagos adventicios debido a que disminuyen la dominancia apical y de igual forma, generalmente inhiben la formación de raíces, retardan el envejecimiento y tienen influencia en la diferenciación de los tejidos (Jiménez, 2004).

Las citocininas interactúan con las auxinas mostrando expresiones diferentes de crecimiento (Jiménez, 2004). Skoog y Miller (1957), demostraron *in vitro* que cualquier cambio en el equilibrio auxinas-citocininas puede afectar las expresiones del crecimiento. Cuando la proporción de las citocininas con respecto a las auxinas es menor, se produce el desarrollo de raíces, pero cuando ésta es mayor, se desarrollan brotes y cuando ésta relación es intermedia, se presenta el desarrollo de tejidos de callo no diferenciado.

### ***Poliaminas***

Las poliaminas son un grupo de compuestos formados por dos o más grupos amino que participan en varios procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, entre los que se encuentran la división celular, la diferenciación de hojas, flores y raíces, el desarrollo de la flor y el fruto, la senescencia de órganos, etc. (Hopkin, 1999; Tiburcio *et al.*, 1993).

Estos compuestos se pueden encontrar de forma libre o conjugada, como amidas, unidas a macromoléculas (proteínas o ácidos nucleicos), compuestos fenólicos. En las plantas se localizan en tejidos meristemáticos y en tejidos de crecimiento activo teniendo relación con la división o alargamiento celular, mientras que en los tejidos senescentes se encuentran niveles bajos de poliaminas (Tiburcio *et al.*, 1993).

### ***Otros reguladores.***

Existen otros grupos de reguladores de crecimiento; sin embargo, debido a su escasa o nula utilización en el cultivo de tejidos se pueden separar de los dos anteriores. Entre éstos se encuentran las giberelinas, el ácido abscísico, el etileno y las oligosacarinas. Estas sustancias no son esenciales para la inducción de órganos, pero pueden actuar como moduladores de la respuesta morfogénica (Ammirato, 1986).

### 3.2.5. Agentes gelificantes.

Los agentes gelificantes se utilizan en el cultivo de tejidos para solidificar el medio y de esta manera suplir de oxígeno al explante y permitir la absorción adecuada de las diferentes sales y nutrimentos que posee el medio (Endress, 1994).

El agar, en sus diferentes presentaciones, es el agente gelificante más frecuentemente utilizado en la micropropagación (cuadro 2). Éste es una mezcla de polisacáridos que se obtiene a partir de algas marinas de los género *Gelidium*, *Gracilaria* y *Pterocladia*, que tiene la capacidad de hidratarse y formar una red, adquiriendo la estructura de un gel (Pierik, 1990); se utiliza en concentraciones de 0.6-1% siendo un factor de gran importancia para ello el pH del medio, ya que cuando éste es inferior a 3.5, el agar no gelifica de manera adecuada.

**Cuadro 2.** Descripción de los principales productos usados como gelificantes

Tipo de Agar	Descripción	Dosis Recomendada (g·l <sup>-1</sup> )
Agar	Uso general. Investigación o producción comercial	6 a 12
Agar Bacteriológico	Para la mayoría de trabajos bacteriológicos	*
Agar tipo A	Buen grado bacteriológico	6 a 12
Agar tipo E	Uso general.	5 a 10
Agar tipo M	Uso general	5 a 10
Agar alta solidificación	Cuando se requiere firmeza en el medio	4 a 6
Agar Purificado	Investigación y cultivo de protoplastos	9 a 10
Agar lavado	Investigación y cultivo de protoplastos preparado a partir de agua purificada	9 a 10
Agarosa	Gelifica a baja temperatura	6 a 10
Agar algínico	Para cultivo, de protoplastos o células en suspensión	*
Agargel	Mezcla de agar y phytigel que mejora ambos productos.	3,5 a 5
Phytigel	Produce un gel transparente de alta solidificación	1,5 a 2

\* Información no disponible.

Fuente. Palma y Montero. 2002

Otro agente gelificante es el gelrite, el cual es un heteropolisacárido aniónico natural producido por una bacteria que forma, en presencia de sales solubles, un gel semejante al agar, quebradizo y rígido; se trata de un compuesto de ácido glucurónico, ramnosa, glucosa y residuos O-cetil que se utiliza generalmente en concentraciones de 0.15-0.30% habiendo sido sugerido por Szabados *et al.* (1991) que esta sustancia puede remplazar eficazmente a muchos agentes gelatinizadores y medios líquidos, sin afectar su eficacia.

Existen otras alternativas utilizadas como gelificantes, entre ellas encontramos a los polímeros sintéticos, como el Biogel P200, los alginatos para el cultivo de protoplastos vegetales y los polímeros de almidón (Pierik, 1990).

Debido a que el agente gelificante es el componente más caro de los medios nutritivos sólidos, diferentes autores han buscado alternativas de menor costo como son el almidón de maíz, cebada, papa, arroz, trigo, el sago y el ibsugol<sup>1</sup> (Bahattacharya *et al.*, 1994; Zimmerman *et al.*, 1995; Puchoo *et al.*, 1999; Naik and Sarkar, 2001).

**Cuadro 3.** Concentración de minerales en algunos agentes gelificantes

Componente	Agente Gelificante		
	Bacto Agar, Difco®	Gelrite®	Almidón de maíz
Ceniza(%)	2,2	7,09	0,16
Nitrógeno(%)	0,02	0,07	0,09
Magnesio(%)	0,24	0,4	0,02
Calcio(%)	0,45	0,89	*
Cobre(ppm)	2	6,81	1,95
Hierro(ppm)	2,87	8,63	1,26
Zinc(ppm)	4,6	9,18	0,13

\* No detectado.

Fuente. Puchoo *et al.*, 1999.

<sup>1</sup> El Sago es un material compuesto de almidón que se obtiene de la médula del tallo de *Metroxylon sagu* y utilizado como alimento para bebés. El ibsugol es un mucílago coloidal obtenido de la vaina de *Plantago ovata* y es utilizado como laxante. Ambos de gran utilización en la India.

La concentración y el tipo de agente gelificante utilizado puede tener efectos drásticos en el crecimiento y desarrollo de los explantes, tal como lo demuestran Szabados *et al.* (1991). Siendo la hiperhidricidad uno de los efectos relacionados con ello, habiéndose encontrado que al aumentar la concentración de agar, si bien disminuye la hiperhidricidad, también disminuye el crecimiento y desarrollo de brotes (Singah *et al.*, 1990). Aparentemente la respuesta a la concentración de agar puede ser específica para cada especie (Brand, 1993) e igualmente puede afectar la eficiencia del cultivo de tejidos ya que se alteran las tasas de difusión y, por ende, la disponibilidad de los componentes en el medio (Szabados *et al.*, 1991).

### **3.2.6. Agua.**

Este compuesto es de gran importancia ya que constituye el 95% del medio, por lo que es necesario prestar atención a la calidad de agua que se utiliza (Pierik, 1990); es por eso que la utilización de agua destilada es imprescindible, a fin de evitar la presencia de elementos no deseados en el medio y así asegurar el desarrollo adecuado de los explantes.

### **3.2.7. pH.**

El rango del pH apto para el crecimiento de tejidos es de 5 a 6. Un pH alto (arriba de 7) o bajo (debajo de 4.5) generalmente frena el crecimiento *in vitro* (Pierik, 1990).

Algunos factores que dependen de él y dejan clara cuál es la importancia del pH del medio son:

- a. Afecta la solidificación de los agentes gelificantes.
- b. Afecta la solubilidad de algunas sales (fosfato o hierro), pudiendo éstas formar precipitados a valores bajos o altos del potencial hidrógeno.
- c. Afecta la absorción de algunos nutrimentos por parte del explante, como es el caso del ión amonio.
- d. Fuera de este rango óptimo, disminuyen la estabilidad de la vitamina B<sub>1</sub> y del ácido pantotónico.

Generalmente, el pH se trabaja entre 5.2 y 5.8, dependiendo del medio de cultivo, y ajustándose éste durante su preparación, con soluciones de NaOH y HCl en concentraciones de 0.1 y 1.0 M; al respecto, es necesario tomar en cuenta que el pH del medio puede variar con el proceso de esterilización, teniendo generalmente un descenso de 0.3 a 0.5 unidades (Pierik, 1990).

### **3.2.8. Otros componentes.**

#### ***Caseína hidrolizada (CH)***

La caseína hidrolizada se suministra como fuente extra de nitrógeno reducido con el fin de aumentar el crecimiento, habiendo sido utilizada de manera rutinaria como suplemento de medios de cultivo. (Kirkorian, 1991).

#### ***Carbón activado***

Se obtiene de la carbonización de la madera y se enriquece para eliminar impurezas. Contiene una red muy fina de poros y una gran superficie interna, en la cual pueden ser adsorbidas todo tipo de sustancias.

Tiene diversas funciones entre las que se encuentran la adsorción de pigmentos tóxicos de tipo fenólico y compuestos orgánicos; puede promover la embriogénesis somática, la estabilización del pH y modificar el crecimiento de raíces debido al oscurecimiento del medio.

### **3.3 Medios de cultivo.**

El establecimiento del cultivo de tejidos depende en gran medida de dos importantes factores: el tipo de explante y el medio que se utilice, los cuales varían según el objetivo que se busque. Una vez definido el objetivo, es necesario utilizar un medio de cultivo adecuado que cuente con los elementos necesarios para el desarrollo de dicho explante.

Para crecer, las células requieren de una gran variedad de nutrimentos, estos se dividen en macro y micro dependiendo de la cantidad en que son requeridos. Aunque las plantas verdes intactas son autótrofas, las células que se encuentran en sus centros de crecimiento son heterótrofas, pues obtienen los estimulantes orgánicos complejos a partir de las células verdes.

La composición de nutrimentos esenciales (N, S, P, K, Mg, Ca) para el crecimiento de las plantas en medios líquidos se conoce desde 1865 (Leifert *et al.*, 1995); sin embargo, la detección de los micronutrimentos requeridos y de los cuales las plantas sólo consumían pequeñas cantidades no fue tarea fácil debido, por un lado, a las impurezas que se presentaban en las sales utilizadas y la inexactitud existente en vasos y demás recipientes utilizados para su. Es hasta mediados del siglo XX que existieron sales, agua y recipientes de suficiente pureza y exactitud, para poder conocer y demostrar la naturaleza esencial de algunos micronutrimentos.

Hacia el final del siglo XIX, J. Von Sachs estableció la técnica del cultivo de plantas en agua, ahora conocida como hidroponía (Bidwell, 1979). Posiblemente, los primeros medios de cultivos para las plantas fueron las soluciones nutritivas utilizadas para estudiar aspectos fisiológicos relacionados con su nutrición (Endress, 1994).

Desde 1940 se han desarrollado gran cantidad de investigaciones en tejidos vegetales sobre requerimientos nutrimentales en medios estrictamente definidos. En la década de los 60's, se hicieron intentos por cultivar tejidos vegetales, callo o células en soluciones nutrimentales, similares a las utilizadas en medios hidropónicos *in vivo* (Gautheret, 1955). Tiempo después se iniciaron trabajos adicionando carbohidratos, vitaminas y aminoácidos al medio; ya que a pesar de que muchos de estos suplementos no eran esenciales para el cultivo *in vitro*, sí se observaba un incremento en las tasas de su crecimiento (Leifert *et al.*, 1995).

Durante esta misma década (1960), varios investigadores experimentaron con medios en altas concentraciones de nutrimentos minerales; desarrollo que coincidió con el descubrimiento de las citocininas como reguladores de crecimiento. Como resultado de estos dos aspectos, se obtuvo un incremento en las tasas de crecimiento de cultivo de

células, callo y brotes, utilizando las concentraciones adecuadas de auxinas y citocininas. (Leifert *et al.*, 1995). Es por esto que las principales combinaciones nutrimentales de los medios de cultivo se desarrollaron en la década de los 60 e inicios de los 70's (Cuadro 1).

En la actualidad existen una gran cantidad de formulaciones conteniendo entre 15 y 35 diferentes compuestos químicos que suministran carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, un agente gelificante y otros compuestos. Entre las más utilizadas encontramos las de Hoagland y Zinder (1933), White (1954), Lind y Staba (1961), Murashige y Skoog (1962), Braun *et al.* (1962), Gamborg *et al.* (1968), Schenk y Hildebrandt (1972), Kao y Michayluk (1975) y Chu *et al.* (1975) (Ramage y Williams, 2002; Leifert *et al.*, 1995; Krikorian, 1991).

La composición de los diferentes medios de cultivo ha cambiado a través de los años, al igual que las concentraciones utilizadas; asimismo se han añadido diferentes elementos que anteriormente no se utilizaban (cuadro 4). En los medios de reciente desarrollo (MS, B5, N<sub>6</sub>) cabe destacar las altas concentraciones de nitrógeno y potasio que tienen con respecto al medio White.

El medio de Murashige y Skoog (1962) es el más utilizado, aproximadamente el 25% de todos los trabajos publicados para cultivo de tejidos y más del 50% de todas las plantas producidas por micropropagación (Leifert *et al.*, 1995). El valor de este medio se atribuye a sus altos niveles de  $\text{NH}_4^+$  y de  $\text{K}^+$  (Krikorian, 1991).

En general, los tejidos vegetales se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de las mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos vegetales, ya que contienen el mínimo esencial de los elementos requeridos por ellos. Sin embargo, muchos tejidos no presentan crecimiento en soluciones relativamente simples, requiriendo para lograrlo, la presencia de otros elementos y sustancias promotoras del crecimiento como pueden ser el agua de coco, la caseína hidrolizada, los extractos de levadura y malta y otros semejantes (Roca *et al.*, 1991).



**Cuadro 4.** Composición de Algunos Medios de Cultivo

Medio	Hoagland y Snyder (1933)	White (1954)	Murashige y Skoog (1962)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)	Schenk y Hildebrandt (1972)	Chu <i>et al.</i> (1975)
Abreviación	H&S	W	MS	B5	S&H	N <sub>6</sub>
<b>Macronutrientos</b>						
KNO <sub>3</sub>	506	80	1900	2500	2500	2830
NH <sub>4</sub> NH <sub>3</sub>	-	-	1650	-	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1180	300	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	-	440	150	200	166
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	493	720	370	250	400	185
KCl	-	65	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136	-	170	-	-	400
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	300	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	16.5	-	150	-	-
Na <sub>2</sub> S · 4	-	200	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	134	-	463
<b>Micronutrientos</b>						
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	7.0	22.3	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	-	-	-	10.0	10.0	4.4
ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	3.0	8.6	2.0	1.0	1.5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	1.5	6.2	3.0	5.0	1.6
KI	-	0.75	0.83	0.75	1.0	0.8
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	-	-	25 µg	25 µg	0.2	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	-	-	250 µg	250 µg	0.1	-
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	-	25 µg	25 µg	0.1	-
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	-	27.8	-	15.0	27.85
NaFeEDTA	-	-	-	28.0 S <sup>b</sup>	-	-
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	-	-	37.3	-	20.0	37.25
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	2.5	-	-	-	-
<b>Vitaminas</b>						
Myo-Inositol	-	-	100	100	1000	-
Tiamina-HCl	-	-	0.1	10.0	5.0	1.0
Ácido nicotínico	-	-	0.5	1.0	5.0	0.5
Piridoxina-HCl	-	-	0.5	1.0	0.5	0.5
Ca <sub>D</sub> pantotenato	-	-	-	-	-	-
Biotina	-	-	-	-	-	0.05
Ácido fólico	-	-	-	-	-	0.5

Expresado en mg l<sup>-1</sup> excepto en los citados de otra manera.

<sup>b</sup>S= 330 Fe acompañado (FeDTPA).

Fuente: Ramage y Williams, 2002.

Leifert *et al.* (1995) indicaron que muchos autores han intentado investigar el crecimiento vegetal en un solo medio, y que éste generalmente es el Murashige y Skoog (1962), obteniendo resultados satisfactorios; sin embargo, no han comparado la tasa con crecimiento en otros medios ni en otras concentraciones totales; siendo por tanto muy

difícil determinar las composiciones nutrimentales que permitan la mayor tasa de crecimiento para cada cultivo.

### 3.3.1 Morfogénesis

Existen dos patrones de diferenciación en la propagación *in vitro*: la organogénesis y la embriogénesis somática, los cuales son procesos que ocurren en la naturaleza *in vivo* (Litz and Jarret, 1991).

Ambos procesos son exclusivos uno del otro, ya que las células solo pueden seguir un camino de diferenciación. Los brotes adventicios pueden diferenciarse de los embriones somáticos en ciertas características de desarrollo:

- a. La embriogénesis se genera a partir de una sola célula, resultando una estructura bipolar, teniendo como resultado la formación de brote y de raíz, mientras que la organogénesis resulta de la formación de células meristemáticas, ya sea radiculares o de brotes, dando como resultado el desarrollo de dicho órgano.
- b. Los embriones somáticos al ser estructuras bipolares, cuentan con un sistema vascular cerrado, mientras que en la organogénesis, el tejido vascular es continuo entre los meristemas adventicios y el callo.

#### ***Organogénesis.***

Es la formación de yemas o meristemas directamente a partir de los explantes, o a partir de callos y raíces; siendo la relación de auxina:citocinina un factor de gran importancia a tomar en cuenta en el medio utilizado para la formación de las yemas y raíces; también se deben incluir vitaminas e inositol como componentes esenciales para el crecimiento y diferenciación de callos, así como nitrógeno orgánico y caseína hidrolizada, para iniciar su crecimiento (Litz y Jarret, 1991).

Esta se ha logrado inducir a partir de cultivos de callos, órganos, células y protoplastos vegetales, siendo altamente influenciada por factores como el genotipo, estado fisiológico y edad del explante. Otros factores que influyen son aquellos que tienen que ver con las

condiciones del cultivo *in vitro*, como son la luz, la temperatura y las concentraciones hormonales que se utilizan en el medio de cultivo.

Los medios más utilizados para obtener organogénesis son: Murashige y Skoog (1962), White (1963), Gamborg *et al.* (1968), Linsmaier *et al.* (1965), Schenk *et al.* (1972) y Heller (1953).

### **3.4. Consistencia del medio.**

La tasa de crecimiento y la producción de brotes en la micropropagación, puede ser influenciadas por el estado físico del medio, pudiendo éste encontrarse en dos estados: semisólido, cuando se utiliza algún agente gelificante, o líquido cuando no se le utiliza.

#### **3.4.1. Medio semi-sólido.**

El medio semisólido es aquel que contiene algún gelificante como los que se mencionaron anteriormente y algunas de las ventajas de los medios semisólidos son:

- Los explantes mantienen la misma orientación durante el cultivo, ya que se encuentran fijos en el medio.
- El material vegetal está sostenido sobre el medio, por lo que no se requieren sistemas especiales de aereación.
- Los brotes y raíces crecen más ordenadamente que en el medio líquido, por ser un medio estacionario (George, 1993).

Sin embargo, también existen desventajas en la utilización de esta clase de medios como son:

- Algunos agares contienen sustancias inhibitorias que pueden prevenir la morfogénesis en algunos cultivos (George, 1993).
- Las tasas de crecimiento pueden ser lentas, además de que los exudados tóxicos del explante no se disipan rápidamente.

- El gel adherido a las raíces de las plántulas requiere su remoción antes de que ésta se trasplante a algún sustrato (George, 1993).

### 3.4.2. Medio líquido.

Los medios líquidos son necesarios para las suspensiones celulares, pero también se pueden obtener ventajas con su uso en los cultivos de callo y órganos, habiéndose obtenido en muchas ocasiones, tasas de crecimiento mayores en medios semisólidos, así como mayor propagación de brotes, crecimiento y embriogénesis somática en diferentes especies (Alvard *et al.*, 1993), debido a que el explante tiene una mayor superficie expuesta al medio y porque al ser posible proporcionarle agitación, los gradientes de difusión entre el medio y el explante son menores; por lo que estos dos factores permiten que exista una mayor asimilación de nutrimentos y reguladores de crecimiento (George, 1993).

Se creó que la ausencia de agente gelificante puede incrementar la disponibilidad para el explante, tanto del agua como de las sustancias disueltas (Alvard *et al.*, 1993). Otras ventajas son que los metabolitos tóxicos que pueden acumularse en las cercanías del tejido, se dispersan efectivamente y que el subcultivo requiere menor tiempo, ya que los explantes no necesitan ser posicionados en el medio, pues únicamente se ponen en contacto con él. En algunos trabajos realizados en medios líquidos se ha encontrado que produce mejores resultados que en medios solidificados con agar, como es el caso de Douglas (1984) y Skidmore *et al.* (1988) (Puchooa *et al.*, 1999) quienes encontraron que la producción de brotes es mayor en *Rhododendron* y en *Pinus caribea* respectivamente.

La aireación es uno de los principales factores a tomar en cuenta en esta clase de medios, debido a que el material vegetal requiere una adecuada cantidad de oxígeno necesario para células, tejidos u órganos sumergidos, el cual puede ser obtenido por agitación, rotación de los contenedores o mediante la introducción de aire estéril al vaso del cultivo. Alvard *et al.* (1993), mencionan que la falta de oxígeno en los explantes pequeños es uno de las mayores limitantes en su crecimiento y que la inmersión parcial de los explantes proporciona una mejor aireación y evita la hiperhidratación, ya que éstos no se encuentran en una constante exposición al medio (González, 2003).

Trabajos como el de Puchooa *et al.* (1999) compararon medios líquidos estáticos con un soporte de papel filtro contra medios líquidos en agitación (90 rpm) junto con medios gelificados con diferentes agentes en cultivo de hojas de tabaco, obteniendo los resultados más altos en producción de materia seca, peso en fresco y producción de brotes en el medio líquido en agitación, seguido por el solidificado por Gelrite. Estos autores mencionan que la diferencia en la respuesta entre este medio líquido y los otros dos, se debe a que la agitación promueve el intercambio gaseoso y al mismo tiempo elimina en el medio los efectos de la gravedad para la sedimentación y la formación de gradientes de nutrimentos y reguladores de crecimiento. Sin embargo, a pesar de los beneficios que se logran con los medios líquidos, también se han encontrado algunas desventajas, entre las cuales George (1993) menciona:

- El tejido delicado puede dañarse debido al movimiento, el cual se puede dar por colisión.
- Los brotes que se encuentren constantemente sumergidos en el medio, pueden hiperhidratarse y quedar inservibles para la micropropagación

Se han hecho intentos por realizar la propagación con medios líquidos a gran escala, aunque muchos de éstos se han visto frustrados precisamente debido a la hiperhidratación (George, 1993). Una de las alternativas es la adaptación de biorreactores a la micropropagación los cuales, gracias a la automatización pueden ahorrar en mano de obra y por tanto, en los costos de producción (Kee-Yoeup, 2001).

Una técnica que se ha utilizado es la conocida como de doble fase en la cual, en una primera fase, se establecen los explantes en medios semisólidos y en la segunda, se transfieren a medios líquidos para promover un rápido crecimiento de los brotes, evitando así una alta tasa de hiperhidricidad en las etapas jóvenes del cultivo (George, 1993; Pierik, 1990).

### **3.5. Insumos de bajo costo en la micropropagación.**

Las ventajas de tener plantas reproducidas con técnicas que garanticen características adecuadas de calidad fitosanitaria, además de ser vigorosas y genéticamente mejoradas, son

el resultado del cultivo de tejidos en condiciones controladas de laboratorio y constituyen, a la vez, las razones por las que la micropropagación goza de gran aceptación por parte de productores de plantas, tal y como lo demuestra la demanda mundial de plantas producidas en laboratorio para su posterior adecuación al medio productivo, mismo que tiene ya un mercado internacional anual con un volumen de 600 a 700 millones de plántulas, convirtiéndolo en un interesante nicho de trabajo para todas las empresas especializadas en biotecnología vegetal.

Sin embargo, la utilización de la tecnología de cultivo de tejidos no ha podido beneficiar a laboratorios que tienen recursos limitados, por ser una técnica con costos muy elevados tanto en las instalaciones como en su producción. Por esto, algunos investigadores han dedicado sus esfuerzos a tratar de disminuir los costos requeridos para la micropropagación. Tal es el caso de Kodym *et al.* (2001), quienes midieron el desarrollo de explantes de banano en un invernadero con luz natural como cuarto de crecimiento obteniendo evidencia de que la micropropagación realizada con luz solar es mayor que la llevada a cabo en el cuarto de crecimiento convencional, además de obtenerse mejor calidad en los brotes; sin embargo, a lo largo del año existen diferencias en el crecimiento cuando se trabaja de esta forma, debidas a la variación estacional, por lo cual son obtenidos mejores crecimientos en verano.

Parte importante en el costo de la técnica *in vitro* es el gelificante, por lo cual se han realizado investigaciones para disminuir este costo mediante la utilización de otros de menor costo, entre los que encontramos el almidón de maíz combinado con el Gelrite, con el cual se reportó haber obtenido mayor cantidad de brotes y mayor cantidad de peso seco (Zimmerman *et al.*, 1995) que en los explantes cultivados con agar. Por otro lado, Bahattacharya *et al.* (1994) y Naik y Sarkar (2001) utilizaron Sago e Isubgol como agentes gelificantes en una variedad de Crisantemo y papa respectivamente, obteniendo crecimientos óptimos tanto en longitud de brotes, número de hojas y peso fresco en ambas especies, pudiendo reducir los costos.

Al respecto, en el Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales, perteneciente al Instituto Tecnológico de Costa Rica, también se han iniciado trabajos utilizando insumos de

bajo costo. Jiménez (2004) utilizó un medio que contenía sales minerales para sistemas hidropónicos (marca INDAGRO®), vitaminas para consumo humano (Neurobine®) y almidón de maíz como agente gelificante, en la micropropagación de explantes de plátano, obteniendo diferencias significativas con el medio Murashige y Skoog (1962) (MS), siendo menor en el número de brotes, longitud de brotes y número de hojas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 *Ubicación de la investigación.*

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Centro de Investigación y Desarrollo de la Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH), perteneciente al Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos (ITCR, SSC), ubicado en Santa Clara, Provincia de Alajuela, Costa Rica.

### 4.2 *Material experimental.*

Se utilizaron como explantes callos generados a partir de ápices de raíces adventicias de *Vanilla planifolia* Andrews obtenidos *in vitro* en medio semisólido que contenían las sales de Murashige y Skoog (1962), suplementados con  $400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina,  $100 \text{ mg/l}$  de mio-inositol,  $0,50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $0,50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de piridoxina-HCl,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de tiamina,  $2,00 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicina,  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  caseína hidrolizada y  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de benciladenina (BA).

El cultivo del callo se realizó en tubos de ensayo de 25 mm de diámetro y 150 mm de alto, con 10 ml de medio, mismos que se esterilizaron antes de la siembra.

### 4.3 *Condiciones de cultivo.*

El experimento se mantuvo en un cuarto de crecimiento a una temperatura de  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , bajo un fotoperiodo de 12 horas luz empleando como fuente lámparas de luz fluorescente con intensidades lumínicas de  $37 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ .

El sistema líquido se mantuvo en agitación constante mediante un agitador orbital a una velocidad 110 rpm.

### 4.4 *Diseño experimental.*

Se cultivaron callos de *Vanilla planifolia* en dos medios semisólidos y dos líquidos (cuadro 6): el testigo, que estaba constituido de sales de Murashige y Skoog (1962), suplementado con  $400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de glutamina,  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de mio-inositol,  $0,50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $0,50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de piridoxina-HCl,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de tiamina,  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de



sacarosa y  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de benciladenina, solidificado con agar (0,6% m/v); y un medio con sales suplidas por fertilizantes para cultivos de sustrato hidropónico, 1 pastilla/l de vitaminas para consumo humano marca Neurobine® (contiene  $50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  piridoxina-HCl,  $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  tiamina y  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  cianocobalamida), gelificado con  $70 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de almidón de maíz (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Comparación entre la concentración de sales minerales y vitaminas entre Murashige & Skoog y soluciones el medio de bajo costo utilizado ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de medio).

	Murashige & Skoog, 1962	Solución hidróponicas
Nitrógeno	840	500
Fósforo	26	200
Potasio	781	400
Calcio	120	200
Magnesio	37	176
Boro	1,10	1,80
Manganeso	91,30	2,00
Zinc	1,85	1,20
Yodo	0,64	0,00
Molibdeno	0,10	0,10
Cobre	0,01	0,50
Hierro	5,56	7,80
Cobalto	0,01	0,00
Mio-inositol	100	0
Tiamina-HCl	0,1	200
Ácido Nicotínico	0,5	0
Piridoxina-HCl	0,5	50
Cianocobalamida	0	1
Glicina	2	0

Fuente: Jiménez, 2004

En el medio líquido, se cultivo callo que presentaba cierto grado de diferenciación celular (coloración verdosa), proveniente de medio semisólido con agar y, de igual forma, se utilizaron los mismos medios que en la fase anterior, pero sin adicionarles gelificantes.

El pH del medio se ajustó a  $5,7 \pm 0,1$  antes de la adición de los gelificantes y se realizaron sub cultivos en medio fresco cada 30 días. El medio se esterilizó antes de la introducción del los explantes a  $1,4 \text{ Kg cm}^2$  y  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos por litro.

**Cuadro 6.** Distribución de los tratamientos

<i>Tratamiento</i>	<i>Variación consistencia del sustrato</i>	<i>Medio de cultivo</i>
1 (testigo)	Semisólido	MS
2	Semisólido	SH
3	Líquido	MS
4	Líquido	SH

MS- Murashige y Skoog (1962); SH- medio con sales para sistemas hidropónicos.

#### **4.5 Diseño experimental.**

El modelo estadístico que se utilizó para analizar los datos obtenidos durante 12 semanas fue un diseño completamente aleatorio, con 15 repeticiones por tratamiento, generando 48 unidades experimentales, las cuales tuvieron un callo por cada una.

##### **4.5.1 Variables evaluadas.**

Para cuantificar el comportamiento de los tratamientos (Cuadro 6) se realizaron evaluaciones cada ocho días durante 12 semanas para los medios semisólidos y 8 para los medios líquidos, midiendo las siguientes variables:

##### ***Número de brotes.***

Se determinó por medio de un conteo visual, considerando los que presentan tamaños iguales o superiores a 5 mm y no considerando los brotes sumergidos en el medio de cultivo.

***Longitud de brotes.***

Con la utilización de un Vernier se realizó la medición desde la inserción del brote, hasta el extremo apical obteniendo las medidas en milímetros.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados que son expuestos comprenden hasta la décimo segunda semana para las soluciones en medio semisólido, mientras que para los tratamientos en medio líquido se establecieron en ocho semanas, esto se valoró en virtud de que la plantas que fueron transferidas a medio líquido no presentaron respuesta si no se encontraban previamente diferenciadas, por lo que tuvieron que estar 4 semanas más en el medio base (MS); a diferencia de los explantes del tratamiento 2, que aunque cambiaron las características del medio, de MS a almidón de maíz, no presentaron una respuesta negativa a pesar de no contar con brotes diferenciados al realizar el cambio de medios. Por su parte, los del tratamiento 1, por seguir en iguales condiciones, no resintieron ningún cambio que limitara su crecimiento *in vitro*.

Al realizar los análisis de varianza correspondientes, se llegaron a encontrar diferencias significativas, tanto en el número, como en la longitud de brote, las cuales de detallan a continuación.

### 5.1 Número de brotes.

De acuerdo al análisis de varianza, se encontraron diferencias significativas en cuanto a número de brotes se refiere, donde los tratamientos 1, 2 y 4, son estadísticamente similares; a su vez, los tratamientos 3 y 4 son similares entre sí, aunque el 3 completamente diferente a 1 y 2 (Cuadro 7). Sin embargo, los explantes que mayor número de brotes presentaron, son los del tratamiento 2 (7.267), que fueron sometidos al medio de cultivo semisólido, con sales hidropónicas, siendo 12% mayor que el tratamiento que le precede, pero 125% mayor que los del tratamiento 3, donde se sometieron los explantes a un medio de cultivo MS en líquido, y que tuvieron el menor número de brotes (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Comparación de medias del número de brotes de vainilla *in vitro* en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Promedio	
2	7.267	a <sup>z</sup>
1	6.467	a
4	4.533	a b
3	2.467	b

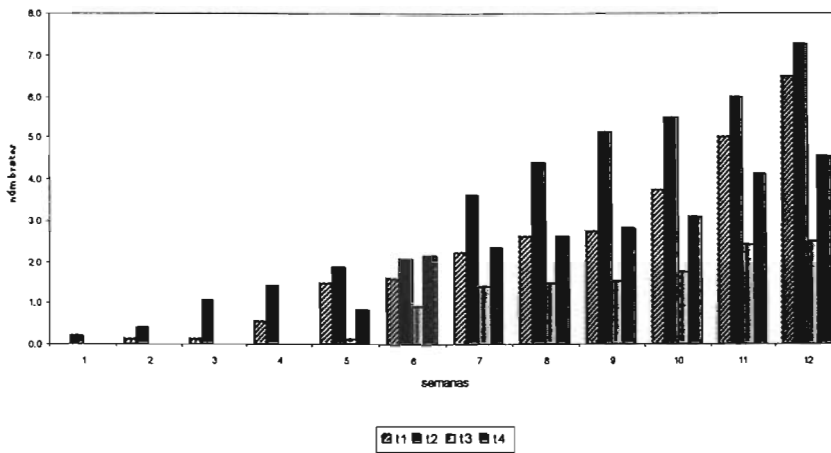
<sup>z</sup>Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey ( $\leq 0.05$ )

En general, se observó que existe una influencia directa de la consistencia del medio de cultivo, siendo los tratamientos líquidos los que menor número de brotes presentaron, lo cual pudo deberse a un estrés en los explantes, causado por el cambio de condiciones que sufrieron al ser trasladados del agar al líquido, manifestando características de hiperhidricidad que concuerdan con la apariencia que mencionaron Debergh *et al.* (1983), quienes consideraron que una de las causas de esta condición puede estar relacionada con el estrés. De hecho, los explantes solo tuvieron expresión en el medio líquido cuando previamente presentaban diferenciación en el medio sólido, por tanto no puede considerarse que la naturaleza del gelificante haya tenido un efecto directo en la expresión del número de brotes, aunque sí en su crecimiento; además de la posible influencia que pudo generar el almidón de maíz como lo reportaron Zimmerman *et al.* (1995) y Smykalova *et al.* (2001), quienes encontraron que en este carbohidrato en combinación con gelrite, la tasa de multiplicación es mayor para los cultivos de manzana y frambuesa y *Humulus lupulus*, respectivamente, que si sólo es utilizado un medio gelificado como agar.

Al realizar una comparación entre tratamientos a través del tiempo (gráfica 1) observamos que los explantes sometidos a medio MS en líquido se mantuvieron sin incremento entre la tercera y quinta semana, lo que se manifestó en el resultado final al ser quien menor número de brotes obtuvo; mientras que en los demás tratamientos se mantuvo un incremento secuencial a través del tiempo; de hecho, los explantes del tratamiento 4 presentan el mismo comportamiento que los sometidos a la misma solución de nutrientes (hidropónica) pero de diferente medio de soporte (almidón de maíz), pudiéndose observar

que a la octava semana de ser transferidos, en ambos tratamientos se tiene similar número de brotes, y por tanto se podría esperar que el medio líquido, con solución hidropónica, a la décima segunda semana de muestreo tuviera la misma cantidad de brotes que el tratamiento 2 en su última evaluación.

**Gráfica 1.** Desarrollo del número de brotes a través de las semanas de evaluación de vainilla *in vitro* en diferentes medios de cultivo.



Con relación a la concentración de nutrientes en los medios de cultivo se observó que las plantas sometidas a MS tuvieron menor número de brotes que aquellas que se colocaron en solución hidropónica (Cuadro 7), lo cual pudo deberse a las diferencias de concentraciones nutrimentales que existen entre las soluciones; de hecho, la vainilla *in vivo* muestra bajas condiciones de desarrollo al aplicar exceso de fertilizantes químicos (Arriola y Rivera, 1984), además que el nitrógeno puede ocasionar un diferencial en el movimiento de los azúcares a otras zonas de demanda (Salisbury y Ross, 1994; Maldonado *et al.*, 2000). Es importante establecer que si bien en todos los tratamientos se adicionó caseína y al ser esta una proteína hidrolizada, permite un incremento en la velocidad de algunos procesos fisiológicos, de tal forma, se requiere de mayor energía; por tanto, los explantes sometidos

a almidón de maíz (tratamiento 2) al contar con mayor concentración de carbohidratos, tuvieron un aumento tanto en el número de brotes, como en el crecimiento de los mismos.

Por otra parte, es importante considerar que en la respuesta presentada por los diferentes tratamientos no solo intervino la cantidad de carbohidratos, pues la variación de nutrimentos en el medio también puede influir en ella. De tal forma, la solución hidropónica, la cual contiene una mayor concentración de P, tuvo un incremento considerable en el número de brotes, analizando particularmente en cada consistencia del medio (Cuadro 5), lo cual es congruente con lo expuesto por Ramage y Williams (2002), quienes manifestaron que el fósforo en el medio de cultivo es de gran importancia tanto para la morfogénesis, como para el crecimiento de los explantes, siendo el mineral limitante en muchos cultivos de tejidos, lo cual comprobaron en hojas de tabaco, donde encontraron que este elemento es consumido del medio rápidamente en los explantes formando brotes y aumentando el crecimiento de los mismos. Además, existe una relación entre el fósforo y el nitrógeno, presentándose mayor madurez del explante cuando es se tiene más proporción del primero, incrementando con ello la formación de nuevos brotes y no solo el crecimiento de los ya existentes, siendo consistente por lo reportado por Salisbury y Ross (1994), así como Bonilla (2000) que un exceso de nitrógeno puede retardar la maduración de las plantas y que una abundancia de fósforo la puede incrementar.

Otro elemento que pudo estar involucrado en la expresión de los explantes en medio hidropónico con relación a los del MS, es el calcio, el cual es del orden del 66% mayor en el primero con respecto al segundo (Cuadro 5), el cual no sólo está implicado en la formación de estructuras de la plantas, sino como un mediador de diversos procesos fisiológicos, (Ramage y Williams, 2002). Trabajos como el de Arruda *et al* (2000) en *Eucalyptus urophylla* mencionan que un incremento en la concentración de calcio incrementa el contenido total de proteínas y azúcares de los explantes, así mismo pueden estimular la formación de embriones somáticos *in vitro* como lo reportaron Jensen *et al.* (1990) en *Daucus carota*, por tanto, al conocer estos efectos en plantas se puede intuir que la diferencia de este elemento en los medios de cultivo utilizados, generaron un diferencial en la respuesta del número de brotes, teniendo mejor resultado en aquellos donde se tenía mayor concentración de calcio, lo cual es similar a lo encontrado por Capitani y Altamura

(2004) quienes midieron la respuesta de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aplicado de manera exógena en explantes de tabaco, comprobando que este elemento promovió la formación de meristemas en las primeras fases de su diferenciación para constituir órganos.

## 5.2 Longitud de brotes.

De acuerdo al análisis de varianza, se encontró diferencia significativa siendo el tratamiento 2 estadísticamente diferente a los demás tratamientos (Cuadro 8), el cual tuvo un mayor crecimiento de los brotes, siendo 75% superior del tratamiento que le precede (tratamiento 4).

**Cuadro 8.** Comparación de medias de la longitud de brotes de vainilla *in vitro* en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Promedio (mm)	
2	27.294	a
4	15.583	b <sup>z</sup>
3	11.903	b
1	11.554	b

<sup>z</sup>Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey ( $\leq 0.05$ )

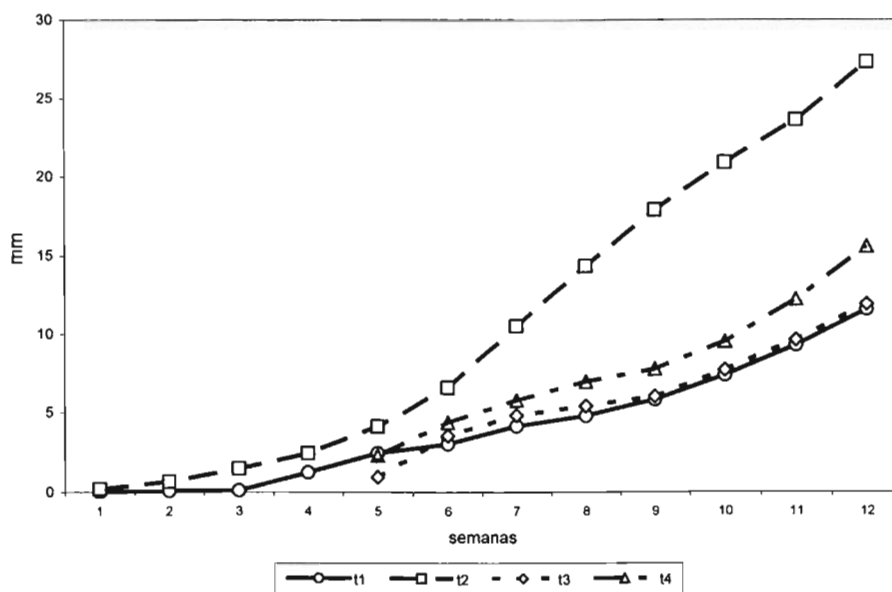
Al observar el comportamiento de crecimiento de la planta (gráfico 2), se observó que todos las plantas tuvieron un incremento exponencial en su longitud a través del tiempo, teniendo valores de correlación arriba de 0.94, siendo las plantas en solución hidropónica las que mayor longitud de brote alcanzaron al término de las evaluaciones, lo cual implica que el crecimiento seguirá siendo muy elevado.

Sin embargo, no se puede considerar que exista una relación directa en lo que a la consistencia del medio se refiere; puesto que dependiendo del medio de cultivo utilizado, su efecto no es similar, es decir, cuando se observa la longitud que presentan los brotes sometidos a MS, es mayor en aquellos que se ubican en medio líquido, mientras que con



solución hidropónica resulta un mayor incremento en el medio sólido. Una posible razón de este hecho es que el medio semisólido de la solución hidropónica cuenta, aparte de la concentración de sacarosa estandarizada para los tratamientos, con una mayor cantidad de carbohidratos por efecto del almidón de maíz, pues pudiendo este ser tomado por el explante como lo mencionan Suzuki *et al.* (2004), quienes analizaron el contenido de carbohidratos y agua en diferentes segmentos de espárragos cultivados *in vitro*, concluyendo que los carbohidratos proporcionados de manera exógena en el medio de cultivo, penetran gradualmente sin importar el tipo de carbohidratos del que se trate.,

**Gráfica 2.** Desarrollo de la longitud de los brotes a través de las semanas de evaluación de vainilla *in vitro* en diferentes medios de cultivo.



A pesar de que la sacarosa es la fuente de carbono de mayor utilización en la micropropagación, cuya concentración va del 2 al 5% (Thompson y Thorpe, 1987), y que genera mejores resultados que otras fuentes de carbono para la regeneración de brotes

(Tang *et al.*, 2003) y producción de biomasa en las células (Yen-HE *et al.*, 1999), existen varios trabajos en los que se ha utilizado el almidón como fuente de carbono obteniendo resultados favorables; tal es el caso de Vargas-Suárez *et al.* (1996) y Yen-HE *et al.* (1999) quienes encontraron que esta fuente genera un mayor número de cloroplastos y niveles de proteínas solubles en cultivos de maíz y soya *in vitro*, que otras fuentes como la sacarosa y la glucosa, lo cual dio como resultado mayor crecimiento de los explantes y de sus brotes. Asimismo, Batty y Dunwell (1989), encontraron que la utilización de maltosa, el principal componente del almidón, en el medio *in vitro*, generó mayor inducción y desarrollo de embriones somáticos en cultivo de anteras en petunia y alfalfa. Por tanto, al corroborar que el almidón es una fuente potencial de carbohidratos en el cultivo de tejidos, se puede inferir que en los explantes del tratamiento 2 al tener mayor cantidad de azúcares, se favoreció el crecimiento de los brotes con respecto al de los otros tratamientos.

Por otra parte, el crecimiento de los brotes pudo también ser influido por la concentración de elementos en los medios de cultivo; de hecho, los explantes que se encontraban en solución hidropónica tuvieron mayor tamaño, en este caso uno de los elementos que pudo estar influyendo en la respuesta es el fósforo, el cual como lo observaron Lee-EunJu, *et al.* (1999), al probar dos concentraciones de este elemento con un diferencial de 60%, produjo una mayor adición de fósforo en el medio MS en plantas de *Limnium* spp, generando el mayor número de hojas, área foliar, peso seco y crecimiento de raíces.

Ramage y Williams (2002) mencionaron que el tipo de agente gelificante que se utilice en el medio de cultivo puede tener grandes efectos en el crecimiento y desarrollo de los explantes y que el agar afecta la disponibilidad del agua y de los componentes disueltos en ésta, lo cual también es corroborado por algunos autores como Puchooa *et al.* (1999), quienes al probar gelrite, bacto-agar, diferentes tipos de agar y almidón de maíz como gelificantes, encontraron que éste último genera mayor suavidad del medio de cultivo, permitiendo un mayor ingreso de compuestos nutrimentales (agua y nutrimentos), dando como respuesta mejor crecimiento, que aquellos donde el medio es más gelificado; lo que es consistente con lo expresado por el tratamiento 2 de este trabajo, donde los brotes que se encontraban en almidón de maíz como gelificante tuvieron mejor respuesta en comparación con los demás tratamientos. De forma similar, es posible que los explantes del tratamiento

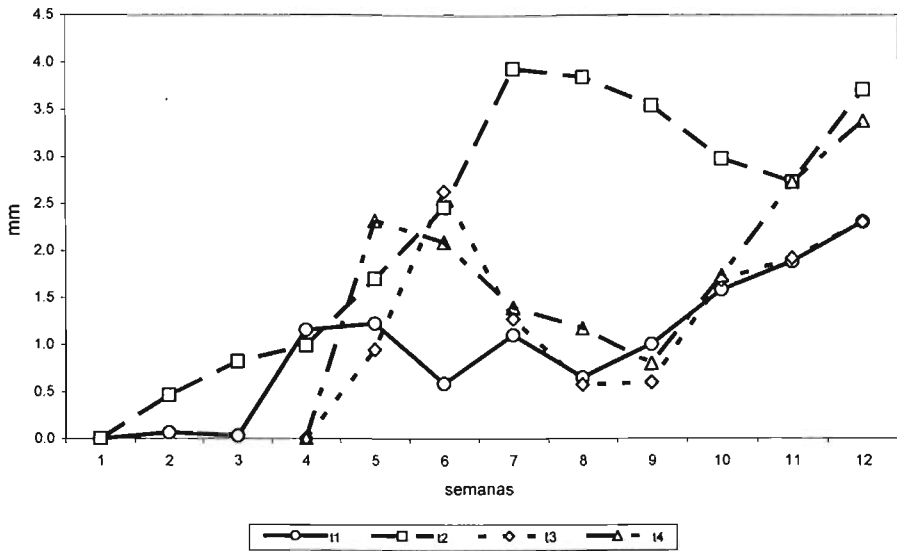
1, que se encontraban en agar, tuviera menor crecimiento en comparación con los cultivados en medio líquido, aunado a que este tratamiento pudo presentar limitantes en esta variable por tener mayor número de brotes formados, en comparación con los tratamientos 3 y 4, donde se observa que a mayor formación de brotes menor tamaño de éstos, lo cual pudo ser compensado en el tratamiento 4, en el que también se tuvo una mayor cantidad de brotes por la concentración de nutrimentos con respecto al medio MS.

De acuerdo al gráfico 3, el mayor incremento de tamaño se presenta para el tratamiento 1 en la cuarta semana de evaluación; mientras que para los demás tratamientos comienza en la primera semana a partir de la transferencia a los diferentes medios de cultivo. Después de esta fecha, la disminución en el promedio de crecimiento semanal se establece en forma lineal negativa; es decir, en los primeros días durante la diferenciación del explante se tiene un elevado crecimiento, para posteriormente establecerse en un decremento de la velocidad de crecimiento, conformando una pendiente  $R^2$  negativa, pero no significativa. Sin embargo, a pesar de que el comportamiento es similar en todos los tratamientos, las plantas que fueron sometidas a solución hidropónica y almidón sigue siendo superior, aún en el comportamiento de crecimiento relativo en comparación con los otros tratamientos.

De acuerdo al crecimiento relativo de los brotes en todos los tratamientos (gráfico 3), se observa que existe una correlación directa entre la longitud del brote y el tiempo transcurrido, en cuanto a los medios sólidos se refiere, a diferencia de los medios líquidos que, aunque su correlación es positiva, no es significativa. En todos los tratamientos, la velocidad de crecimiento es de tipo sigmoideal, lo cual puede deberse a procesos de mayor formación celular y no solo de alargamiento, indicando procesos sucesivos de división y distensión. Ante tal hecho, las plantas de los tratamientos 2, 3 y 4 pudieron alcanzar mayor tamaño por tener procesos de crecimiento sostenidos durante mayor tiempo, mientras que las del 1 son menores; los brotes sometidos a solución hidropónica en almidón de maíz particularmente, también pudieron estar influenciados por la rápida asimilación de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo, pues la disminución en su velocidad de crecimiento se presenta cuando se observó una disminución del medio.

El crecimiento relativo del tratamiento 4 es muy similar al que tuvo el tratamiento 2, lo que podría indicar que el crecimiento total del tratamiento en medio líquido debería llegar a la décima segunda semana a ser muy similar al del tratamiento 2, pues como se observa en la gráfica 3, el tamaño de los brotes en la octava semana a partir de su transferencia (semana 12 del tratamiento 2 y semana 8 del tratamiento 4) es similar.

**Gráfica 3.** Crecimiento relativo semanal de los brotes en vainilla *in vitro* en diferentes medios de cultivo.



## 6. CONCLUSIONES.

1. El tratamiento que tuvo mejor respuesta en el número de brotes y crecimiento de los mismos es en el que se aplicó solución hidropónica, con almidón de maíz como gelificante (tratamiento 2).
2. La mayor concentración de azúcares proporcionada, tanto por el almidón de maíz, como la adición de sacarosa, generó mejor respuesta en la formación y crecimiento de brotes.
3. La mayor concentración de fósforo y calcio en el medio de cultivo a base de solución hidropónica, tuvo un mejor efecto en el número y crecimiento de brotes, comparado con lo del medio MS.
4. El tratamiento 3, solución MS en líquido tuvo menor número de brotes y el tratamiento 1, solución MS en agar tuvo menor tamaño de los brotes.
5. Los tratamientos a base de solución hidropónica tuvieron similar comportamiento en el número y crecimiento de brotes a la octava semana después de ser transferidas al medio de investigación.
6. Los tratamientos a base de medio líquido tuvieron menor número de brotes que aquellos donde se aplicó un gelificante.
7. La respuesta del medio líquido solo se presenta cuando el material vegetativo tiene una diferenciación en el medio sólido que le antecede, en caso contrario existe hiperhidratación del explante.
8. Existe un comportamiento sigmoïdal en el crecimiento de los brotes en todos los tratamientos, estableciéndose una relación directa positiva entre el tiempo y el crecimiento de los brotes.

## 7. Anexo 1 : Cuadros

Cuadro 1. Fuentes de carbono utilizadas para el cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	11
Cuadro 2. Descripción de los principales productos usados como gelificantes .....	15
Cuadro 3. Concentración de minerales en algunos agentes gelificantes .....	16
Cuadro 4. Composición de Algunos Medios de Cultivo .....	21
Cuadro 5. Comparación entre la concentración de sales minerales y vitaminas entre Murashige & Skoog y soluciones el medio de bajo costo utilizado ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de medio). .....	29
Cuadro 6. Distribución de los tratamientos .....	30
Cuadro 7. Comparación de medias del número de brotes de vainilla <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo. ....	33
Cuadro 8. Comparación de medias de la longitud de brotes de vainilla <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo. ....	36

## 8. Anexo 2 : Gráficos

Gráfica 1. Desarrollo del número de brotes a través de las semanas de evaluación de vainilla <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo.....	34
Gráfica 2. Desarrollo de la longitud de los brotes a través de las semanas de evaluación de vainilla <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo.....	37
Gráfica 3. Crecimiento relativo semanal de los brotes en vainilla <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo.....	40

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

Ahuja M.R. 1993. *Micropropagation à la carte*. En: Ahuja M.R. *Micropropagation of woody plants*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands 1993. pp.1-9

Alatorre C.F. 2002. *Estudio morfogénico e histológico del híbrido Vanilla Planifolia X Vanilla pompona Schiede obtenido in vitro*. Tesis: Ing. Agrónomo especialista en fitotecnia. Universidad Autónoma de Chiapingo, Chiapingo, México. 86p.

Alvard D.; F. Cote and C. Teisson. 1993. *Comparison of methods of liquid culture for banana micropropagation*. *Plant cell, Tiss. Org. Cult.* 32: 55-60.

Arriola V. y F. Rivera. 1984. *Estudio aerotécnico de la Vanilla planifolia Andrews*. En la zona de Papantla, Ver. Tesis: Ing. Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 113p.

Arruda S.C.C.; G.M. Souza; M. Almeida and A.N. Gonçalves. 2000. *Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on Eucalyptus urophylla callus morphogenesis in vitro*. *Plant cell, Tiss. Org. Cult.* 63 (2): 142-154.

Batty N. y J. Dunwell. 1989. *Effect of maltose en the response of potato anthers in culture*. *Plant cell, Tiss. Org. Cult.* 18: 221-226.

Bhattacharya P.; S. Dey and B.C. Bhattacharya. 1994. *Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant culture*. *Plant cell, Tiss. Org. Cult.* 37: 15-23

Bidwell R. 1993. *Fisiología vegetal*. Trad. Jerónimo G.; Rojas M. Segunda edición. México. AGT Editor S.A. 780 p.

Bonilla I. 2000. *Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales*. En: Azcon-Bieto J. y Talón M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill. España. 83-97 pp.

- Brand M. H. 1993. *Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (Amelanchier arborea) shoots in vitro*. Plant cell, Tiss. Org. Cult. 35: 203-209.
- Capitani F. and M.M. Altamura. 2004. *Exogenous calcium enhances the formation of vegetative buds, flowers and roots in tobacco pith explants cultured in the absence of exogenous hormones*. Plant cell, Tiss. Org. Cult. 77 (1): 1-10.
- Claridades Agropecuarias. No. 101. Enero 2002. pp 3 - 26.
- Davidonis G. and D. Knorr. 1991. *Callus formation and shoot regeneration in Vanilla planifolia*. Food Biotechnol. 5: 59-66.
- Debergh P.; J. Aitken-Christie; D. Cohen; B. Grout; S. von Arnold; R. Zimmerman and M. Ziv. 1992. *Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation*. Plant cell, Tiss. Org. Cult. 30: 135-140.
- Debergh P. C.; Y. Harabaoui and R. Lemeur. 1981. *Mass propagation of globe artiochke (Cynara scolymus): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential*. Physiol. Plant 53:181-187
- Devlin R. M. 1980. *Fisiología vegetal*. Trad. Llimona X. Tercera edición Omega. Barcelona, España., S. A. 517p
- Elkonin L., and N. Pakhomova. 2000. *Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum*. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 61 (2): 115-123.
- Endress, R. 1994. *Plant cell biotechnology*. Berlín, Alemania, Springer-Velag. 353p.
- Fisichella M.; E. Silvi and S. Morini. 2000. *Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different microelement composition*. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 63 (2): 101-107.
- Geetha S. and A.S. Sudheer. 2002. *In vitro propagation of Vanilla planifolia, a tropical orchid*. Current science, 79 (6): 886-889.



- George E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. 2<sup>nd</sup> Edition. Edington, U. K. Exegenetics. pp. 183-230.
- George P. S. and G.A. Ravishankar. 1997. In vitro *multiplication of Vanilla planifolia using axillary bud explants*. Plant Cell Reports 16:490-494.
- González L. S. 2003. *Respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión*. Tesis: Bach. Ing. Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica., Cartago, Costa Rica. 67p.
- Gu Z.; J. Arditti and L.P. Nyman. 1987. *Vanilla planifolia: Callus induction and plantlet production in vitro*. Lindleyana 2: 48-52
- Hopkins W.G. 1999. *Introduction to plant physiology*. Second edition John Wiley & Sons, Inc., USA. 512p.
- Jain N. and S.B. Babbar. 2003. *Effect of carbon source on the shoot proliferation potential of epicotyl of Syzygium cuminii*. Biologia Plantarum 47 (1): 133-136.
- Jarret, J. R. and R. Fernández. 1984. *Shoot-tip vanilla culture for storage and exchange*. Plant Genetic Resources Newsletter. 59: 25-26.
- Jiménez Z. A. 2004. *Micropropagación de plátano (Musa AAB, cv Curraré) en un Medio de Cultivo con Sustitución de Insumos*. Tesis: Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica., San Carlos, Costa Rica. 58p.
- Kee-Yoeup Paek.; Eun-Joo Hahn and Sung-Ho Son. 2001. *Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:149-157.
- Knudson, L. 1950. *Germination of seeds of vanilla*. En: American Journal of Botany. 37: 241-247.
- Kodym A. and F.J. Zapata-Arias. 2001. *Low-cost alternatives for the micropropagation of banana*. Plant cell, Tiss. Org. Cult. 66: 67-71.

- Kononowicz H. and J. Janick. 1984. *In vitro propagation of Vanilla planifolia*. Hort. Science. 19: 58-59
- Krikorian, A D. 1991. *Propagación clonal in vitro*. En: Roca, W. M. y L.A. Mroginski, (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).Cali, Colombia. 41-77.
- Lee-EunJu; Jeong-ByoungRyong; Lee E.J. and Jeong B.R. 1999. *Effect of initial phosphorus level in the medium on the in vitro plantlet growth of Limonium spp. "Misty Blue"*. Jour. Korean Soc. Hort. Sci. 40: 2, 253-256.
- Leifert C.; K.P. Murphy. and P.J. Lumsden. 1995. *Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures*. Critical Reviews in Plant Sciences, 14(2): 83-109.
- Litz, R.E. and R.L. Jarret. 1991. *Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis*. En: Roca, W. M. y Mroginski, L.A (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).Cali, Colombia. 143- 172 pp.
- Maldonado J.M.; E. Agüera y R. Pérez-Vicente. 2000. *Asimilación del nitrógeno y del azufre*. En: Azcon-Bieto J. y Talón M. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. España. 235-246.
- Montero C. W. 2001. *Estudio morfológico e histológico de Echinacea purpurea in vitro*. Tesis: Bach. Ing. Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica., Cartago, Costa Rica. 67p.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Naik P.S and D. Sarkar. 2001. *Sago: An alternative cheap gelling agent for potato in vitro culture*. Biol. Plant. 44 (2): 293-296.
- Parra Q., R. A. 1987. *Cultivo in vitro y anatomía de óvulos de vainilla (Vanilla planifolia Andrews)*. Tesis. M. C. Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 104 p.

- Palma, T y W. Montero. 2002. *Curso de biotecnología orientada a la micropropagación de especies tropicales*. Curso impartido para profesores del Colegio Técnico Agrícola de Pital San Carlos. San Carlos, Costa Rica. Editorial Tecnológica. 50 p.
- Philip, V. J. and S. A. Z. Nainar. 1986. *Clonal propagation of Vanilla planifolia (Salisb.) Ames using tissue culture*. Journal Plant Physiology. 122:211-215.
- . 1988 a. *Structural changes during the in vitro germination of Vanilla planifolia (Orchidaceae)*. Ann. of Botany 61:139-145.
- . 1988 b. *In vitro transformation of root meristem to shoot and plantlets of Vanilla planifolia*. Ann. of Botany 61:193-199
- Pierik R. L. M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Trad. Eyerbe M. L. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 57- 84.
- Puchooa D.; P.N. Purseramen and B.R. Rujbally. 1999. *Effects of medium support and gelling agent in the tissue culture of tobacco (Nicotiana tabacum)*. Sci. and Tech. 3:129-144.
- Ramage C. M. and R.R. Williams. 2002. *Mineral nutrition and plant morphogenesis*. En Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 38:116-124.
- Roca, W. M. y L. A. Mroginski. 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).Cali, Colombia. 19-40
- Salisbury, F. y C. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericano. México. 759 P.
- Segura J. 1993. *Morfogénesis in vitro*. En: Azcon-Bieto J. y M. Talón. Fisiología y bioquímica vegetal. McGraw-Hill. España. 381-392 pp.

- Seiskandarajah S.; R. Skirvin and H. Abu-Gaoud. 1990. *The effect of some macronutrients on adventitious root on scion apple cultivars in vitro*. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 21(2): 185-189.
- Singha S.; E.C Townsend and G.H. Oberly. 1990. *Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (Cydonia oblonga Mill.) shoots in vitro*. Plant cell, Tiss. Org. Cult. 23 (2):135-142
- Smykalova I.; M. Ortova; H. Lipavska and J. Patzak. 2001. *Efficient in vitro micropropagation and regeneration of Humulus lupulus on low sugar, starch-Gelrite media*. Biologia Plantarum 44 (1): 7-12.
- Suzuki T.; S. Nakamura; M. Akiyama and K. Oosaka. 2004. *Accumulation of short-chain fructo-oligosaccharides in excised stem and root tissues of asparagus cultured on carbohydrate-rich medium*. Journal of Japanese Society for Horticultural Science 73 (2): 119-127.
- Szabados L.; V.M. Núñez; L.M. Tello; G. Mafla; J. Roa y W.M. Roca. 1991. *Propagación clonal in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L. A (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 79-93.
- Tang G.X.; W.J. Zhou; Li H.Z.; B.Z. Mao; Z.H. He and K. Yoneyama. 2003. *Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oilseed Brassica spp.* Jour. Agron. Crop Scien. 189: 5, 351-358.
- Tiburcio A.F.; X. Campo y J.L. Figueroa. 1993. *Poliaminas*. En: Azcon-Bieto J. y M. Talón. Fisiología y bioquímica vegetal. McGraw-Hill. España. 357-379 pp.
- Vargas-Suárez M.; A. Rincón-Guzmán; C. Mújica-Jiménez; R.A Muñoz-Clares and E. Sánchez de Jiménez. 1996. *Influence of carbon source and CO<sub>2</sub> Enrichment on Biochemical parameters associated with photomixotrophy in maize callus cultures*. J. Plant Physiol. 149: 585-591.

Yen H.E.; Chen YuChi; Yen ShiKae; Lin JengHorn; Chen Y.C.; Yen S.K. and Lin J.H. 1999. *Sugar uptake by photomixotrophic soybean suspensions*. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 40: 2, 147-152.

Zimmerman R. H.; S.V Bhardwaj and I.M Fordham. 1995. *Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops*. Plant cell, Tiss. Org. Cult. 43: 207-213.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**