



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN MODALIDAD PASANTÍA

Título: Manejo de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y aplicación de sistemas *in vitro* para la propagación de *Vanilla planifolia*.

Alumno: Maldonado, Adolfo Maximiliano.

Asesor: Lic. (Dra.) Natalia Dolce.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Cátedra de Fisiología Vegetal. Departamento de Básicas Agronómicas.
Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste.

AÑO 2021



Contenido

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS GENERALES	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
TAREAS DESARROLLADAS.....	5
Preparación de medios de cultivo	5
Esterilización de los medios nutritivos	8
Desinfección superficial de material vegetal para su establecimiento <i>in vitro</i>	8
Uso de una cabina de flujo laminar de aire estéril.....	9
Incubación	10
Evaluaciones de las plantas obtenidas luego de la incubación	10
Aclimatación de plantines a las condiciones de crecimiento <i>ex vitro</i>	11
RESULTADOS OBTENIDOS.....	12
CONCLUSIONES.....	14
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15



INTRODUCCIÓN

Con el nombre de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se engloba un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal que puede ser un órgano, tejido, células, protoplastos) es incubado asépticamente en medios de composición química definida y bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991), con el propósito de proporcionarle las condiciones apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (hongos, bacterias).

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan hacia finales del siglo XIX, pero recién en 1922 se logró el primer experimento exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas (Knudson, 1922).

La familia Orchidaceae, una de las plantas más antiguas, cuenta con más de 800 géneros y más de 25000 especies y se caracteriza por la diversidad de las flores de sus plantas. Las orquídeas se consideran especies atractivas desde el punto de vista ornamental, económico y medicinal; sin embargo, también existe una de la que su fruto es comestible, *Vanilla planifolia* Jackson (Jack.) ex. Andrews (Carranza Álvarez *et al.*, 2020). Esta especie es originaria de los bosques tropicales húmedos de México y América Central (Ramírez *et al.*, 1999), y reviste importancia cultural, ecológica, social y económica ya que, al desarrollarse sobre los árboles propios de bosques tropicales y subtropicales, es un elemento de conservación de la flora natural.

Fue descubierta por el pueblo Totonaca, quienes la utilizaban antes de la llegada de los españoles. Para este pueblo la vainilla era una de las plantas más importantes y su uso se extendió entre los pueblos mesoamericanos, quienes la llamaban Xhanat, hasta los aztecas que le dieron el nombre de Tlilxochitl. Previo a la conquista, la bebida conocida como Xocoalt (chocolate) entre los Mexicanos, era condimentada con vainilla, apreciada no solo por su sabor sino por su valor estimulante (Menchaca-Gómez, 2009). Esta orquídea fue declarada planta sagrada y se elevó como ofrenda divina, hasta los adoratorios totonacos, quedando ligada a la cultura agrícola del pueblo (Rodríguez López, 2016).

Hoy día, se reconoce a la región de Papantla como el centro de origen del cultivo de la vainilla y a los Totonacos, como sus primeros cultivadores y beneficiadores (Damirón-Velázquez, 1994).

La gran importancia a nivel mundial es debido a que su fruto se utiliza como saborizante y aromatizante (Bory *et al.*, 2008); en la producción de dulces de alta calidad, como así también en repostería, producción industrial de helados, y chocolates finos. Se comercializan las cápsulas procesadas (palitos de vainilla), el fruto molido (polvo de vainilla) o el fruto mezclado con azúcar (azúcar de vainilla). Otro producto es



el extracto de vainilla, que se utiliza como extracto alcohólico (35% de alcohol) mezclado con azúcar y fijador en diferentes grados de concentración.

Es una planta hemiepífita (terrestre) y la única especie de la familia Orchidaceae con frutos comestibles (González-Arnao *et al.*, 2009). El fruto popularmente conocido como “vaina”, suele medir entre 15 y 23 cm de largo, contiene numerosas semillas de tamaño microscópico. Como las semillas son pequeñas y la cápsula contiene sustancias que impiden la germinación, la reproducción para el cultivo comercial se hace en forma vegetativa mediante plantones o esquejes (Damiron-Velazquez, 2004). Es de clima cálido, se desarrolla en condiciones de luz y sombra bajo temperaturas de entre 20 y 30°C. Una vez que las vainillas se recolectan y para que tengan las características de olor, sabor y textura deseados se lleva a cabo un proceso de curado llamado beneficiado (Carranza Álvarez *et al.*, 2020).

Durante las etapas del proceso de producción de la vainilla, es decir, tanto en el cultivo como en el beneficiado, esta especie vegetal se asocia con microorganismos como los hongos (Soto-Arenas, 2006), algunos de los cuales son patógenos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium sp.* y *Alternaria alternata*), y otros son benéficos (*Trichoderma sp.*, *Tunasnella sp.* y *Epulorhiza sp.*), (Fiorela-Ordóñez, 2012), dado que pueden proporcionarle nutrientes para su desarrollo. El fruto de la vainilla produce la vainillina, una molécula orgánica de fórmula molecular C₈H₈O₃ formada por tres grupos funcionales (un aldehído, un éter y un fenol). Gracias a este compuesto, la vainilla puede darle sabor a una gran variedad de alimentos, de ahí también su importancia económica en todo el mundo (Carranza Álvarez *et al.*, 2020).

La vainilla, al igual que el resto de las orquídeas, presenta problemas para su conservación debido a la amenaza de su hábitat natural y a la baja tasa de germinación. El proceso de germinación de las orquídeas es muy complejo, dado que requiere de la simbiosis (interacción biológica) con algunos hongos específicos para un proceso ecológico denominado micorrización (es decir, que se asocian a las raíces). Por ello, actualmente se buscan diversas alternativas para lograr una producción masiva que garantice la producción sustentable de esta especie (Carranza Álvarez *et al.*, 2020).

La aplicación de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos *in vitro* es eficaz para llevar a cabo la aclimatación simbiótica. Proceso por el cual la plántula generada *in vitro*, se adapta fisiológica y gradualmente a los cambios del medio ambiente, cuando ésta es traspasada de un frasco de cultivo a una maceta, y es simbiótica cuando este proceso se realiza en coordinación con otro organismo vivo, por ejemplo, una micorriza aislada de una planta de la misma especie que normalmente está presente en condiciones de campo, y ayudará a lograr su adaptación de forma más rápida.



El cultivo de tejidos vegetales (CTV) o propagación *in vitro* involucra diferentes técnicas de cultivo de tejidos, órganos o células vegetales y consiste en regenerar plantas a partir de explantes bajo condiciones de luz y temperatura controlada, cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica (Carranza Álvarez *et al.*, 2020). Uno de los usos más difundidos es la propagación masiva de plantas. Esta técnica es muy utilizada especialmente en especies de importancia económica (hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales) así como con especies de difícil propagación por otros métodos o en vías de extinción. Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción. En los protocolos utilizados generalmente pueden distinguirse las siguientes etapas:

- 1) Elección de la planta y/o tejido donante de explantes.
- 2) Establecimiento *in vitro*: que consiste en la desinfección de los explantes (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir el desarrollo de callo o la diferenciación de órganos o embriones somáticos.
- 3) Multiplicación a partir de los explantes establecidos *in vitro*, para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) Enraizamiento: en algunos casos es necesaria esta etapa, en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes obtenidos en plantas completas.
- 5) Rustificación: que es la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones de crecimiento *ex vitro*.

El éxito de la técnica depende de muchos factores, entre ellos el genotipo, la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), el medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación.



OBJETIVOS GENERALES

- Adquirir conocimientos básicos respecto al manejo de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.
- Formulación de medios basales y de reguladores de crecimiento.
- Preparación y esterilización de medios de cultivo.
- Desinfección de explantes.
- Uso de una cabina de flujo laminar de aire estéril.
- Control de las condiciones asépticas de los cultivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer los fundamentos y obtener destreza en la aplicación de sistemas *in vitro* para la propagación de *Vanilla planifolia* en diferentes medios de cultivo evaluando su potencial de crecimiento.
- Adquirir nociones referentes a la aclimatación de la planta regenerada a partir de esta vía, para su crecimiento en condiciones *ex vitro*.



TAREAS DESARROLLADAS

Las actividades se desarrollaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) que cuenta con la infraestructura necesaria para realizar las actividades propuestas, por lo cual fue propicia la realización de esta pasantía en dicho laboratorio.

Preparación de medios de cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y crecimiento de los cultivos *in vitro*. Se ha descripto un gran número de medios nutritivos para el cultivo de tejidos vegetales (Heller, 1953; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1968; Schenk y Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan, básicamente de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, y una fuente de carbono.

a. Sales minerales. La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (C, H, O, N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (Bo, Mn, Zn, Cu, Co, Cl, Mo, Fe). La concentración de estos elementos dependerá de los requerimientos de las diferentes especies, la finalidad del cultivo o de la formulación a preparar. Representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas.

Las drogas que se utilizan en la preparación de los medios de cultivo son de calidad analítica o pro-análisis dado que, al ser una formulación de composición exacta, deben ser de excelente calidad y no contener otros contaminantes como metales pesados o trazas de otros minerales.

b. Sustancias vitamínicas y aminoácidos. Las vitaminas son utilizadas como catalizadores en varios procesos metabólicos, se agregan al medio de cultivo para estimular el crecimiento de los tejidos. Diversos autores han considerado a la tiamina como esencial para un buen crecimiento de los explantes. La piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina (complejo de vitamina B), han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento de cultivos axénicos.

El myo-inositol (isómero del inositol) también ha sido considerado como parte integrante del complejo vitamínico B, aunque químicamente es un carbohidrato. Se utiliza ampliamente en el medio de Murashige y Skoog (1962) así como en otras formulaciones, a razón de 100mg/L por su efecto estimulante del crecimiento y división celular en numerosas especies.

Los aminoácidos como la glicina son utilizados como fuentes de nitrógeno reducido y son favorables en procesos de activa división celular (proliferación de callos) y en la regeneración de órganos (organogénesis directa y/o indirecta) en explantes cultivados *in vitro*. El aporte de mezclas de aminoácidos generalmente se logra utilizando peptona de soja, peptona de carne, caseína hidrolizada o extracto de levadura.

c. Fuente de carbono. Las plantas cultivadas *in vitro* son heterótrofas, por lo que la



fuente de carbono necesaria debe ser suministrada en el medio básico. En la preparación de un medio de cultivo es de amplia utilización como fuente de carbono la sacarosa en concentraciones de 2 al 5%. También se pueden utilizar glucosa, fructosa, maltosa y galactosa, aunque son menos efectivas y más costosas. En laboratorios de propagación de plantas con fines comerciales, la sacarosa puede ser sustituida por azúcar comercial con buenos resultados y ahorro considerable en los gastos.

d. Agentes gelificantes. Si bien los medios nutritivos pueden ser líquidos o semisólidos, en general son solidificados por medio de un agente gelificante que permite mantener el explante sembrado en la superficie. El agar-agar es el material de soporte más utilizado por proveer al medio de un excelente gel húmedo, permitir una difusión iónica adecuada y una oxigenación correcta en los tejidos sumergidos en el medio nutritivo; presenta apariencia semi cristalina u opaca. Sin embargo, el agar no es fisiológicamente inerte, puesto que posee diversas impurezas que deberán ser tenidas en cuenta al momento de su utilización. Generalmente se utiliza en concentraciones de 5 a 8 g/L.

Por otra parte, el phytigel es un gelificante sintético de alta trasparencia (facilita la detección de contaminantes), con bajo porcentaje de impurezas y gran capacidad gelificante. Aunque se utiliza en menor cantidad (1,5 a 2 g/L), su costo es superior al agar en igualdad de pureza y representa un porcentaje importante en el total del costo del medio nutritivo. El agargel es una mezcla de 3:7 de agar y phytigel.

e. Otros compuestos orgánicos de composición no bien definida. En algunos casos se adicionan al medio de cultivo otros compuestos como ser el carbón activado (CA), el puré de bananas verdes, el agua de coco. De ellos, el CA, es ampliamente utilizado en cultivo *in vitro* porque adsorbe en su superficie porosa las sustancias fenólicas y otras sustancias tóxicas excretadas por los explantes y que se acumulan en el medio nutritivo dañando los tejidos, oxidando a los mismos y provocando su muerte. Asimismo, posee un efecto favorable en el desarrollo radicular al promover el oscurecimiento del medio de cultivo. El CA se utiliza a razón de 250 a 5.000 mg/L y es muy importante conocer la calidad química del mismo. Otra sustancia muy utilizada es el agua de coco, por su rico contenido de auxinas y citocininas naturales, así como vitaminas y azúcares.

En el desarrollo de esta pasantía se trabajó con 2 medios basales: el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) y el medio basal B&G¹.

El primero es un medio de cultivo de uso generalizado en diferentes laboratorios del mundo dado que contiene los micronutrientes y macronutrientes necesarios para el cultivo de diversos tejidos vegetales, como se detalló anteriormente; el segundo está compuesto por todos los nutrientes (14 elementos esenciales para la vida vegetal), azúcares (sacarosa) y carbón activo en cantidades equilibradas para promover una buena germinación de semillas, un buen crecimiento y desarrollo de las plántulas de

¹ Disponible en: <<https://16268-br.all.biz/meio-de-cultura-para-orquideas-940-g-g74655>>



orquídeas (Cuadro N°1). Es especialmente rico en Calcio y Potasio, siendo el Calcio fundamental para la rigidez de las plántulas, y ambos muy importantes para aumentar la tasa de sobrevivencia de plantas durante la aclimatación.

Componentes	Dosis (g/L)	
	MS	B&G
Sales Minerales	4,4	5
Azúcares	30	40
Carbón activado	2	2
Agente gelificante	6,5	6,5

Cuadro N°1: Detalle de los componentes en (g/L) de los medios basales MS y B&G.

Cabe destacar que una de las principales diferencias entre ambos medios nombrados, es que el medio basal B&G ya cuenta con carbón activado en su composición, en cambio, en el medio basal MS se lo adiciona.

El primer paso en la preparación de los medios de cultivo, consiste en retirar del freezer el medio basal concentrado (MS x 10) y descongelarlo en un microondas (3-4 min). Para preparar 2.000 ml de MS en su formulación completa se miden 200 ml de MS x 10 (usando una probeta de 250 ml) y se colocan en el vaso de precipitado, agregando luego 1.800 ml de agua desmineralizada. Se utilizó sacarosa al 3% y se incorporó carbón activado (CA) en concentración de 250 o 500 mg/l. A continuación, se ajusta el pH del medio (usando un pHmetro marca ALTRONIX® modelo TPX1) a 5,6 con el agregado de HCl y/o K(OH) y luego se agrega el agente gelificante (en general se usó agar Sigma® A1296 de calidad ultra en una concentración de 6,5 g/l) para no ensuciar el electrodo del pHmetro (Figura 1).



Figura 1: Preparación del medio de cultivo. Referencias: a: medición del pH; b: pesaje del agente gelificante (agar Sigma® A1296).

Para la disolución del agar, los vasos de precipitado conteniendo los medios de cultivo se colocan dentro de un microondas hasta un incipiente hervor, vigilando periódicamente para evitar derrames dentro del microondas. Una vez disuelto el agar, el medio de cultivo se vierte en los tubos con la ayuda de un dosificador automático.



Los recipientes usados en esta pasantía fueron tubos de vidrio de 16 cm^3 , 50 cm^3 y 80 cm^3 , en los cuales se cultivaron segmentos uninodales de Vanilla.

Esterilización de los medios nutritivos

Los medios de cultivo, se esterilizan en autoclave a $1,45\text{ kg cm}^{-2}$ y $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Esta tarea se realizó utilizando una autoclave manual modelo Chamberlain de 60 cm de profundidad y de 40 cm de diámetro.

Finalizada la esterilización, se retiran los recipientes con los medios de cultivo. Los mismos se dejan enfriar a temperatura ambiente, procediendo a agitarlos suavemente en aquellos medios nutritivos que contienen carbón activado en suspensión para mantenerlos lo más homogéneos posible.

Desinfección superficial de material vegetal para su establecimiento *in vitro*

La primera fase de la operación, es la obtención del material vegetal a cultivar, procurando el uso de tejidos jóvenes y en buen estado fitosanitario. Dependiendo de la especie y el objetivo del trabajo, este puede consistir en semillas, embriones, ápices caulinares o radicales, segmentos de hojas y tallos, anteras, óvulos (Figura 2). En segundo lugar, evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto de suma importancia para el éxito, no solamente en el establecimiento *in vitro* de los cultivos sino también en su ulterior incubación y manipulación durante las etapas de crecimiento y multiplicación.

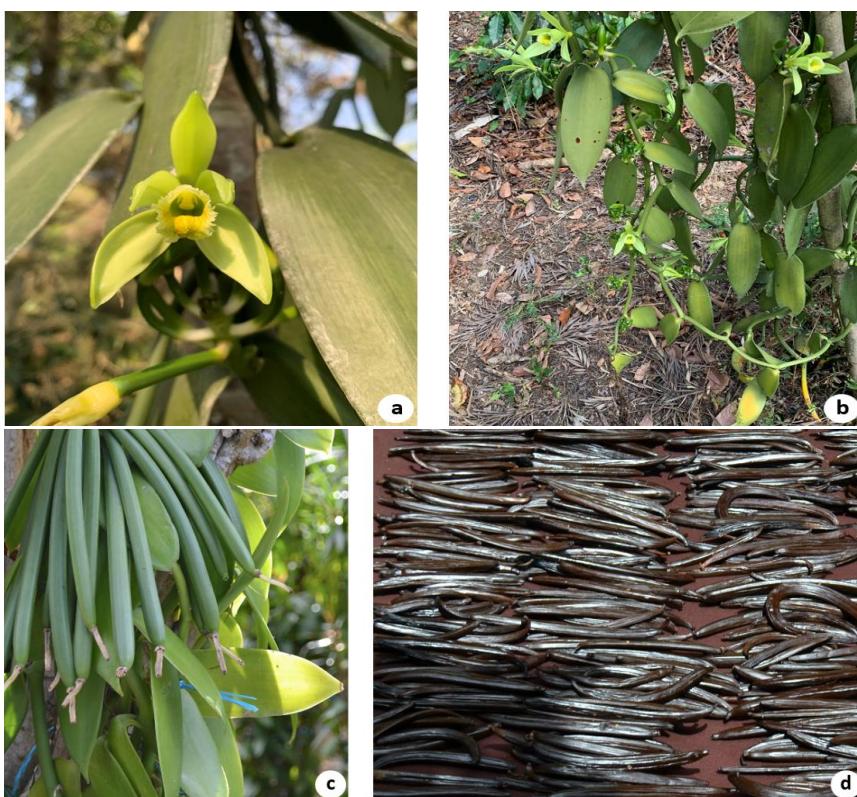




Figura 2: *Vanilla planifolia*. Referencias: a: Aspecto del crecimiento típico de la especie “crecimiento tipo liana”; b: Detalle de una flor; c: Detalle de vainas inmaduras; d: Frutos maduros, principal órgano de comercialización. Fotografías gentileza del Sr. Miguel Ángel Lozano Rodríguez (Méjico).

En esta pasantía se utilizaron segmentos uninodales (explantes menores a 2,5 cm de longitud), que fueron extraídos de los clones que ya formaban parte del stock de material vegetal del laboratorio, por lo cual el proceso de desinfección propiamente dicho no fue realizado. En caso de provenir el material de afuera se realiza a desinfección superficial, mediante su inmersión en una solución de NaClO 2,5% + Triton[→] X- 100 0,1% durante 45 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.

Uso de una cabina de flujo laminar de aire estéril

Se trabajó con una cabina de flujo laminar de aire estéril de la firma CASIBA, modelo HL3, de 196 cm de ancho de mesada x 60 cm de profundidad x 60 cm de alto.

En el interior de la cabina se cuenta con un mechero a gas de llama regulable, para la esterilización de las pinzas, mangos de bisturí y cajas Petri empleados para realizar los cortes y manipulación de los diferentes explantes utilizados.

Previo a su ingreso al área estéril, los tubos conteniendo los medios nutritivos se rocían con alcohol 70%, se procede a retirar su tapa y calentar levemente el borde del tubo para eliminar posibles contaminantes y evaporar el agua de condensación que se forma en esa zona. Luego, se realiza la siembra de los diferentes explantes en la superficie de los medios nutritivos e inmediatamente se procede a obturar los recipientes con doble capa de film de Resinite® (Figura 3).

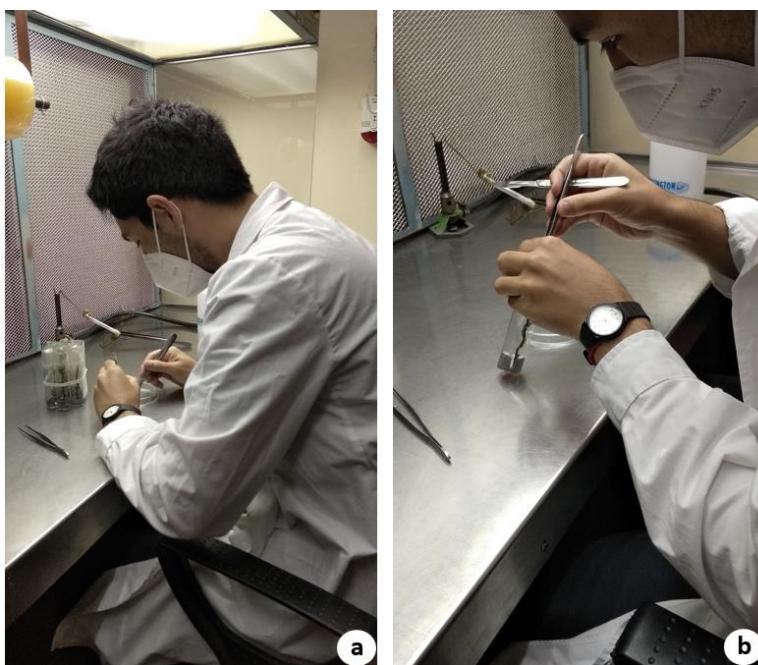




Figura 3: Manipulación del material vegetal en cabina de flujo laminar. Referencias: a y b: extracción de los explantes y posterior siembra en el medio de cultivo.

Incubación

En la producción de plantas *in vitro*, la incubación es el tiempo que el explante permanece en la solución nutritiva bajo condiciones ambientales controladas. Este ambiente controlado se logra mediante el uso de cámaras de incubación, áreas designadas del laboratorio donde se monta el equipamiento necesario para lograr mantener la luminosidad, temperatura y humedad controladas. En el caso de esta pasantía los explantes se incubaron en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ por 2 meses (Figura 4).



Figura 4: Incubación de explantes de *V. planifolia* en cuarto climatizado.

Evaluaciones de las plantas obtenidas luego de la incubación

- 1- Crecimiento: Se midieron variables como ser longitud de tallos (cm); número de nudos, número de raíces, peso seco de tallos y raíces (mg). (Figura 5).
- 2- Aclimatación: Se evaluó el comportamiento *ex vitro* de las plantas obtenidas, realizando labores periódicas como ser: riegos 2 veces por semana, procurando mantener una mayor humedad relativa para las plantas y limpieza del material vegetal contaminado o seco.



Figura 5: Evaluación del crecimiento de las plantas luego de la incubación. Referencias: a y b: detalle de las mediciones realizadas.

Aclimatación de plantines a las condiciones de crecimiento ex vitro

La etapa de aclimatación, involucra la transferencia de las plantas regeneradas *in vitro* a condiciones de crecimiento *ex vitro*, donde las plantas son sometidas a una fase de rusticación. Esta es una de las etapas más crítica en el proceso de microporpagación, debido a que durante la fase de rusticación, las plantas sufren un estrés acentuado a causa de la modificación en las condiciones de crecimiento: que pasan de ser óptimas mientras se encuentran *in vitro* (humedad relativa cercana al 100%, intensidad de luz baja, nutrientes y azúcar disponible) y una vez transferidas a condiciones *ex vitro* esta situación cambia drásticamente a causa de la variabilidad ambiental y por su cambio de condición de heterótrofas a autótrofas obligadas.

A lo largo de esta pasantía se realizó la transferencia a condiciones *ex vitro* de plántulas de *V. planifolia*. Las plántulas fueron removidas de los tubos y lavadas cuidadosamente con agua corriente para eliminar completamente el medio de cultivo, evitando dañar las hojas y raíces. Se seleccionaron plántulas de diferentes tamaños; pequeñas, medianas y grandes. Para el trasplante se utilizaron macetas de plástico, conteniendo en el fondo una capa de piedra de cantera de grano fino (para mejorar el drenaje del agua en exceso), seguida de una capa de musgo *Sphagnum* (para incrementar la retención de humedad) y, finalmente, otra capa de piedras sobre la que se colocaron las plantas (para permitir la sujeción de estas). Además, a cada una se le coloco un “tutor” a modo de permitir una mejor sujeción de estas (Figura 6).

Una vez trasplantadas, fueron llevadas directamente a condiciones de laboratorio incrementando la intensidad lumínica a $160 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para su aclimatación por 60 días.

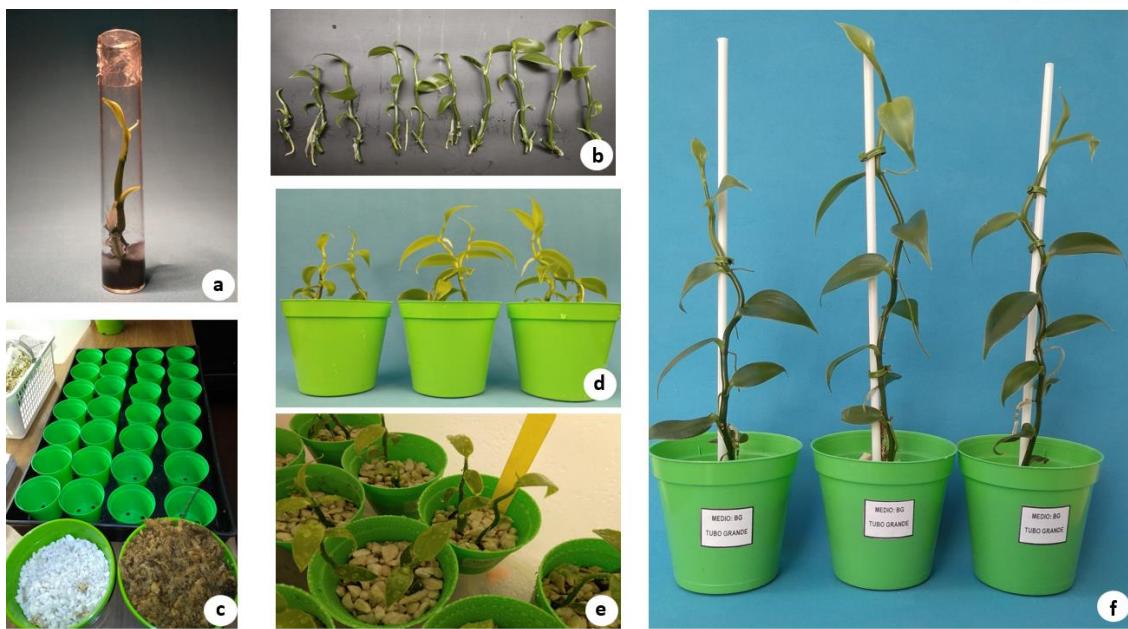


Figura 6: Incubación y crecimiento de *V. planifolia*. Referencias: a: explante en condiciones *in vitro*; b: plántulas retiradas de los tubos y lavadas; c: detalle de macetas y sustrato; d y e: plántulas en condiciones *ex vitro* junto con primer riego de Inicium®; f: plantas luego de 2 meses en condiciones *ex vitro*.

RESULTADOS OBTENIDOS

Las variables analizadas para ambos medios de cultivos fueron: altura de planta (cm), número de nudos, numero de raíces, peso seco de tallos y peso seco de raíces. Se realizaron 3 repeticiones de 10 plantas cada una para los 3 tipos de tubos empleados, esto se repitió para los dos medios basales: B&G y MS.

A continuación, en los cuadros, se presentan los resultados obtenidos (Cuadro N° 2 y 3).

Medio basal MS				
VARIABLES	Tubo CHICO	Tubo MEDIANO	Tubo GRANDE	Promedios
Altura (cm)	6,10	5,85	6,58	6,18
Nº de nudos	3	3	3	3
Nº de raíces	3	3	3	3
PS tallos (mg/pl)	47	45	50	47,33
PS raíces (mg/pl)	11	10	8	9,67

Cuadro N°2. Valores obtenidos de las variables analizadas en el medio basal MS, con diferentes tamaños de tubos (16 cm^3 , 50 cm^3 y 80 cm^3): longitud de tallo (cm); número de nudos y raíces; PS (peso seco) de tallos y raíces (mg).



Medio basal B&G				
VARIABLES	Tubo CHICO	Tubo MEDIANO	Tubo GRANDE	Promedios
Altura (cm)	8,12	7,19	7,50	7,60
Nº de nudos	4	4	4	4
Nº de raíces	4	4	4	4
PS tallos (mg/pl)	84	91	91	88,67
PS raíces (mg/pl)	24	29	23	25,33

Cuadro N°3. Valores obtenidos de las variables analizadas en el medio basal B&G, con diferentes tamaños de tubos (16 cm^3 , 50 cm^3 y 80 cm^3): longitud de tallo (cm); número de nudos y raíces; PS (peso seco) de tallos y raíces (mg).

Analizando los datos, queda demostrado que el tratamiento con el medio B&G fue mucho más eficiente con respecto al MS en todas las variables. Particularmente, tanto la altura, número de nudos y número de raíces, si bien se obtuvo mejores resultados con B&G, no representan una diferencia muy notoria. Por el contrario, en el caso del peso seco, tanto de tallos como raíces sí se pudo notar una mayor diferencia, siendo esta de aproximadamente el doble.



CONCLUSIONES

Luego de haber realizado todos los trabajos mencionados anteriormente, se pudo cumplir con los objetivos establecidos y además obtener resultados satisfactorios en lo referido a la evaluación del comportamiento del material vegetal en diferentes medios de cultivos. Asimismo, quedó demostrado la efectividad de uno de ellos, por haber obtenido mayor vigor de plantas, mayor peso seco, y también mayor número de nudos y raíces. Cabe destacar que en lo referido a la aclimatación ex vitro, el medio B&G también fue el mejor. Esto es de real importancia ya que de los resultados de esta prueba se desprende, la practicidad que tendría la propagación de *V. planifolia* utilizando dicho medio.

Analizando el tema económico se pudo observar que, si comparamos el costo en la preparación de ambos medios, para preparar 1L del medio MS necesitaríamos 233 \$/L y para el medio B&G solamente 100\$/L, siendo esto otra ventaja para resaltar.

En lo que respecta al trabajo llevado a cabo en el laboratorio, se abordaron diferentes temáticas, lo cual hizo que sea una experiencia muy propicia y de mucho aprendizaje, tanto en lo referido a la investigación como también al trabajo en equipo. Por último, cabe mencionar que el desarrollo óptimo de esta pasantía fue gracias al acompañamiento constante de profesionales con basta experiencia en el área.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bory, S., Lubinsky, P., Risterucci, A.M., Noyer, J.L., Grisoni, M., Duval, M.F. y Besse, P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunión Island (Indian Ocean). American Journal of Botany 95(7): 805-815. Cita tomada de: Rodríguez López, T. 2016. La vainilla (*Vanilla planifolia*): perfume y sabor de México que conquistó al mundo: I: Historia de la vainilla. Disponible en: https://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Damirón-Velázquez, R. 1994. La vainilla y su cultivo. Veracruz Agrícola. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria. Gobierno del Estado de Veracruz. Veracruz, México. 50 pp. Cita tomada de: Rodríguez López, T. 2016. La vainilla (*Vanilla planifolia*): perfume y sabor de México que conquistó al mundo: I: Historia de la vainilla. Disponible en: https://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Damiron-Velazquez, R. 2004. La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria. Gobierno del Estado de Veracruz. S/p. Cita tomada de: Revisión Literatura del Cultivo de Vainilla, 2015. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- De Fossard R. 1976. Tissue culture for plant propagators. Department of Botany, University of New England. 409 pp.
- Carranza Álvarez, C., Morales López, A. y Maldonado Miranda, J.J. 2020. Producción *in vitro* de *Vanilla planifolia*. Facultad de estudios profesionales zona huasteca, UASLP.
- Fiorela-Ordoñez, N. 2012. Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. Universidad Nacional de Colombia Sede: Colombia. Cita tomada de: Carranza Álvarez, C., Morales López, A. y Maldonado Miranda, J.J. 2020. Producción *in vitro* de *Vanilla planifolia*. Facultad de estudios profesionales zona huasteca, UASLP.
- Gamborg O.L., Miller R.A. y Ojima K. 1968. Plant Cell Cultures 1. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.
- González-Arnao, M. T., Lázaro-Vallejo, C. E., Engelmann, F., Gámez-Pastrana, R., Martínez-Ocampo, Y. M., Pastelin-Solano, M. C. y Díaz-Ramos, C. (2009). Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, 45(5), pp. 574-582. Cita tomada de: Carranza Álvarez, C., Morales López, A. y Maldonado Miranda, J.J. 2020. Producción *in vitro* de *Vanilla planifolia*. Facultad de estudios profesionales zona huasteca, UASLP.
- Heller R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in



- vitro. Annales des Sciences Naturelles (Botanique) Biologie Vegetale 14: 1-223.
- Knudson, L. 1922. Non symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette. 73: 1-25.
- Menchaca-Gómez, R. A. 2009. La vainilla. La Ciencia y el Hombre. Revista de divulgación y Tecnología de la Universidad Veracruzana Volumen 22 (1). Cita tomada de: Revisión Literatura del Cultivo de Vainilla, 2015. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Mroginski, L.A. y Roca W.M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cita tomada de: Roca W.M. y Mroginski L.A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Ramírez, C.; Rapidel, B. y Mattey, J. 1999. Principales factores agronómicos restrictivos en el cultivo de la vainilla y su alivio en la zona de Quepos, Costa Rica. Memorias del XI Congreso Nacional Agronómico. San José, Costa Rica. 309-313. Cita tomada de: Revisión Literatura del Cultivo de Vainilla, 2015. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Rodríguez López, T. 2016. La vainilla (*Vanilla planifolia*): perfume y sabor de México que conquistó al mundo: I: Historia de la vainilla. Disponible en: https://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Schenk R.V. y Hildebrandt A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50: 199-204.
- Soto-Arenas, M A. 2006. La vainilla: Retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO.